



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN
DE SULFAMETOXAZOL EN SUSPENSIÓN ORAL
PRODUCIDO POR FARBIOVET S.A. MEDIANTE HPLC.”

TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:
JACQUELINE ELENA SUÁREZ BENAVIDES

Riobamba - Ecuador

2015



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN
DE SULFAMETOXAZOL EN SUSPENSIÓN ORAL
PRODUCIDO POR FARBIOVET S.A. MEDIANTE HPLC.”**

**TESIS DE GRADO
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR: JACQUELINE ELENA SUÁREZ BENAVIDES
TUTOR: DR. CARLOS PILAMUNGA

Riobamba - Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE SULFAMETOXAZOL EN SUSPENSIÓN ORAL PRODUCIDO POR FARBIOVET S.A. MEDIANTE HPLC.”, de responsabilidad de la señorita Jacqueline Elena Suárez Benavides, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Cecilia Veloz

DECANA FAC. CIENCIAS

Dr. Felix Andueza

DIRECTOR DE ESCUELA

Dr. Carlos Pilamunga

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Espinoza

MIEMBRO DE TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Jacqueline Elena Suárez Benavides, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO y a la INDUSTRIA FARMACÉUTICA VETERINARIA FARBIOVET S.A.

JACQUELINE ELENA SUÁREZ BENAVIDES

DEDICATORIA

A mis padres Milton Suarez y Elena Benavides, por todo el esfuerzo que realizaron durante todo este tiempo, por el ejemplo de lucha y trabajo, por confiar en mí incondicionalmente, a mis hermanas Katherine, Gabriela y Lady, por estar a mi lado en todo momento, por el sacrificio mutuo, a Alexis Salazar por incentivarme a salir en busca de mejores oportunidades, por su apoyo constante, por impulsarme a crecer y ser mejor cada día.

Jacqueline

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la salud y la fuerza para avanzar cada día.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por todos los conocimientos impartidos así por las vivencias que me han permitido crecer.

A FARBIOVET S.A. por permitirme realizar este trabajo dentro de sus instalaciones, y por impulsar mi crecimiento profesional, de manera especial a la dirección por su confianza; así como a todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo con aportes técnicos y también por su compañerismo.

A mis Padres y hermanas por su amor y paciencia, gracias por confiar en mí y por el sacrificio que realizaron todos estos días. A toda mi familia que ha estado a mi lado apoyándome.

Al Dr. Carlos Pilamunga y al Dr. Carlos Espinoza por su importante colaboración con el aporte de valiosos conocimientos durante la realización de este trabajo.

A Maritza Ortuño. por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias que han sido la base fundamental para la culminación de este proyecto, a Adriana Arévalo. por el apoyo y por sus valiosos consejos para seguir adelante. Gracias a las dos por su amistad y confianza.

Jacqueline

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACC	Analista de Control de Calidad
AGROCALIDAD	Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de la Varianza)
AVAL	Analista de Validaciones
AxCC	Auxiliar de Control de Calidad
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
C	Concentración
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCPt	Control de Calidad Producto terminado
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CG	Cromatografía de gases
CV	Coeficiente de Variación
DNA	Desoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucleico)
E	Estándar
EP	European Pharmacopoeia (Farmacopea Europea)
Ex	Exactitud
FDA	Federal Drug Administration
G	Gramos
HC	Hoja de Cálculo
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
I	Incertidumbre
Ical	Incertidumbre de la Calibración
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
JVAL	Jefe de Validaciones
K	Factor de Cobertura o de Seguridad
<i>K</i>	Factor de capacidad
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
Li	Linealidad
Lia	Linealidad ANOVA

Lirl	Linealidad Regresión Lineal
L	Lote
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N	Número de muestras analizadas
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Paraaminobenzoic acid (Ácido paraaminobenzoico)
PI	Precisión Intermedia
PM	Precisión del Método
POE	Procedimiento Operativo Estandarizado
PS	Precisión del Sistema
R	Coeficiente de correlación
r^2	Coeficiente de determinación
R	Repeticiones
Re	Repetibilidad
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
Ro	Robustez
Rs	Resolución
RSD	Desviación Estándar Relativa
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
S	Desviación Estándar
S_a	Desviación Estándar del término independiente
S_b	Desviación Estándar de la pendiente
SNC	Sistema Nervioso Central
$S_{y/x}$	Desviación Estándar Residual
t_0	Tiempo muerto
T_r	Tiempo de retención
U	Incertidumbre Expandida
UV/VIS	Ultravioleta / Visible
$u(y')$	Incertidumbre Estándar
$u_c(y)$	Incertidumbre Combinada
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

USP	United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos de América)
V_r	Volumen de Retención
V_o	Volumen muerto
X	Variable Independiente (Concentración)
Y	Variable Dependiente (Respuesta)
%R	Porcentaje de Recuperación

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	4
1.2. Antecedentes de investigación	4
1.3. Bases Teóricas	6
1.3.1. Validación.....	6
1.3.2. Calificación.....	7
1.3.3. Calibración.....	7
1.3.4. Tipos de Métodos Analíticos para la validación.....	7
1.3.4.1. Métodos Normalizados.....	7
1.3.4.2. Método normalizado con una modificación significativa	7
1.3.4.3. Métodos Desarrollados por el Laboratorio	8
1.3.5. División de los Métodos según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11 03 39: 06.....	8
1.3.5.1. Categoría I.....	8
1.3.5.2. Categoría II.....	8
1.3.5.3. Categoría III	8
1.3.5.4. Categoría IV	8
1.3.6. Tipos de Validación	9
1.3.6.1. Validación Retrospectiva.....	9
1.3.6.2. Validación Prospectiva	9
1.3.7. Verificación	9
1.3.8. Validación de un método	10
1.3.8.1. Cuando deben ser validados los métodos	10
1.3.8.2. Requisitos para el proceso de validación	10
1.3.9. Plan de Validación o Protocolo de Validación	11

1.3.10.	Desarrollo de Pruebas de Parámetros de Validación	11
1.3.10.1.	Selectividad	12
1.3.10.2.	Linealidad.....	13
1.3.10.3.	Precisión	16
1.3.10.4.	Exactitud	18
1.3.10.5.	Límites de Detección y Cuantificación	18
1.3.10.6.	Robustez	19
1.3.10.7.	Incertidumbre	20
1.3.11.	Evaluar Resultados de la Validación	22
1.3.12.	Medicamento de Uso Veterinario	22
1.3.13.	Formas Farmacéuticas Líquidas	22
1.3.14.	Antimicrobianos	23
1.3.14.1.	Quimioterapia.....	23
1.3.14.2.	Definición.....	23
1.3.14.3.	Clasificación de los antibacterianos.....	23
1.3.15.	Sulfonamidas	24
1.3.15.1.	Historia.....	24
1.3.15.2.	Características fisicoquímicas	25
1.3.15.3.	Mecanismo de acción	25
1.3.15.4.	Efectos adversos	25
1.3.15.5.	Excreción	26
1.3.15.6.	Toxicidad aguda	26
1.3.15.7.	Toxicidad crónica	26
1.3.16.	Sulfametoxazol.....	27
1.3.16.1.	Farmacocinética	27
1.3.16.2.	Mecanismo de Acción	28
1.3.16.3.	Indicaciones.....	28
1.3.16.4.	Dosificación	28
1.3.16.5.	Efectos adversos	28
1.3.16.6.	Tiempo de retiro	29
1.3.17.	Cromatografía.....	29
1.3.18.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	29
1.3.18.1.	Mecanismos de Separación Cromatográfica	30
1.3.18.2.	Instrumentación.....	30
1.3.18.3.	El Cromatograma	32
1.3.18.4.	Volumen y tiempo de retención.....	32
1.3.18.5.	Factor de capacidad (k)	32

1.3.18.6.	Selectividad (α)	32
1.3.18.7.	Eficiencia	33
1.3.18.8.	Resolución Cromatográfica	33
1.3.18.9.	Número de Platos Teóricos.....	33
1.3.18.10.	Asimetría (AF)	33

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	34
2.1.	Lugar de la Investigación	34
2.2.	Protocolo de Validación del Método Analítico para Valorar Sulfametoxazol	34
2.2.1.	Generalidades	34
2.2.2.	Objetivo.....	34
2.2.3.	Alcance / Aplicación	34
2.2.4.	Responsabilidades	35
2.2.5.	Método de Análisis.....	35
2.2.6.	Fundamento	35
2.2.7.	Materiales, Equipos y Reactivos.....	36
2.2.8.	Condiciones Cromatográficas	37
2.3.	Proceso de Validación del Método.....	38
2.3.1.	Criterios de Aceptación de los Parámetros de Validación	38
2.3.2.	Parámetros de Validación	39
2.3.2.1.	Selectividad	39
2.3.2.2.	Linealidad.....	41
2.3.2.3.	Precisión del Sistema.....	45
2.3.2.4.	Precisión del Método.....	46
2.3.2.5.	Repetibilidad	47
2.3.2.6.	Precisión Intermedia	48
2.3.2.7.	Exactitud	50
2.3.2.8.	Límite de Detección (LD).....	51
2.3.2.9.	Límite de Cuantificación (LC).....	51
2.3.2.10.	Robustez.....	51
2.3.2.11.	Incertidumbre	52

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	57
3.1.1.	Validación del Método Analítico para determinar Sulfametoxazol en Suspensión oral mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución	57
3.1.1.1.	Selectividad	57

3.1.1.2.	Linealidad.....	60
3.1.1.3.	Precisión del Sistema.....	63
3.1.1.4.	Precisión del Método.....	64
3.1.1.5.	Repetibilidad	64
3.1.1.6.	Precisión Intermedia.....	65
3.1.1.7.	Exactitud	66
3.1.1.8.	Límite de Detección (LD).....	67
3.1.1.9.	Límite de Cuantificación (LC)	67
3.1.1.10.	Robustez.....	68
3.1.1.11.	Incertidumbre	70
3.2.	Pruebas de hipótesis	74
3.3.	Presentación de resultados	75
CONCLUSIONES		76
RECOMENDACIONES		77
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Cuadro de Dosificación para el Producto Bactrivet.....	28
Tabla 1-2.	Procedimiento para la Preparación de la Fase Móvil.....	37
Tabla 2-2.	Procedimiento para la Preparación del Estándar	38
Tabla3-2.	Procedimiento para la Preparación de la Muestra	38
Tabla 4-2.	Criterios de Aceptación de los Parámetros de Validación.....	39
Tabla 5-2.	Requerimientos de muestras para análisis de Selectividad	39
Tabla 6-2.	Procedimiento para la determinación de la Selectividad	40
Tabla 7-2.	Procedimiento para Análisis de Linealidad	41
Tabla 8-2.	Esquema para la obtención de datos para la Linealidad	42
Tabla 9-2.	Análisis Simple de varianza ANOVA para la Linealidad	44
Tabla 10-2.	Procedimiento para el Análisis de Precisión del Sistema	45
Tabla 11-2.	Esquema para la obtención de datos de la Precisión del Sistema	45
Tabla12-2.	Procedimiento para el Análisis de la Precisión del Método.....	46
Tabla 13-2.	Esquema para la obtención de datos de la Precisión del Método.....	46
Tabla 14-2.	Procedimiento para el Análisis de Repetibilidad	47
Tabla 15-2.	Esquema para la obtención de datos de la Repetibilidad	48
Tabla 16-2.	Procedimiento para el Análisis de la Precisión Intermedia.....	49
Tabla 17-2.	Esquema para la obtención de datos de la Precisión Intermedia.....	49
Tabla 1.	Procedimiento para el Análisis de Exactitud	50
Tabla 19-2.	Esquema para la obtención de datos de la Exactitud	50
Tabla 20-2.	Factores de Variación para el Análisis de Robustez	51
Tabla 21-2.	Procedimiento para el Análisis de Robustez	51
Tabla 22-2.	Esquema de la Matriz Factorial para el diseño de la Robustez	52
Tabla 23-2.	Procedimiento para el Análisis de la Incertidumbre	52
Tabla 24-2.	Esquema para la obtención de datos de la Incertidumbre tipo A	53
Tabla 25-2.	Resumen de los resultados obtenidos en el cálculo de los diferentes tipos de Incertidumbres.....	56
Tabla 1-3.	Análisis de Datos de la Linealidad	60
Tabla 2-3.	Ecuación de la Recta	61
Tabla 3-3.	Test de Homogeneidad (Test de Cochran)	62
Tabla 4-3.	Test de Verificación de la Pendiente o Linealidad	62
Tabla 5-3.	Intervalos de Confianza para la Pendiente	62
Tabla 6-3.	Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad	63
Tabla 7-3.	Intervalos de Confianza para la Variable Independiente	63

Tabla 8-3.	Análisis de datos de la Precisión del Sistema	63
Tabla 9-3.	Análisis de datos de la Precisión del Método	64
Tabla 10-3.	Cálculo de los Intervalos de Confianza para la Precisión del Método	64
Tabla 11-3.	Análisis de datos de la Repetibilidad.....	65
Tabla 12-3.	Cálculo de los Intervalos de Confianza para la Repetibilidad	65
Tabla 13-3.	Análisis de datos de la Precisión Intermedia	66
Tabla 14-3.	Análisis de datos de la Exactitud.....	66
Tabla 15-3.	Esquema de los Factores de variación.....	68
Tabla 16-3.	Matriz Factorial para el Análisis de la Robustez	68
Tabla 17-3.	Determinación de las áreas obtenidas en los diferentes análisis de las Muestras...	68
Tabla 18-3.	Determinación de la Concentración (%) de Sulfametoxazol obtenidas	69
Tabla 19-3.	Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor A.....	69
Tabla 20-3.	Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor B	69
Tabla 21-3.	Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor C	70
Tabla 22-3.	Cálculo de incertidumbre tipo A	70
Tabla 23-3.	Repetibilidad de la pesada para el cálculo de la Incertidumbre (u Rep.)	71
Tabla 24-3.	Cuadro resumen de los tipos de Incertidumbre	73
Tabla 25-3.	Presentación de Resultados	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Fórmula estructural del Sulfametoxazol	27
Figura 2-1. Definición de la Resolución	33
Figura 1-3. Comparación del cromatograma de la muestra y el cromatograma del blanco de matriz.....	58
Figura 2-3. Comparación del cromatograma de la muestra y cromatograma del blanco de matriz adicionado el activo acompañante en la formulación	58
Figura 3-3. Comparación del cromatograma de la muestra y cromatograma del diluyente metanol	59
Figura 4-3. Curva de Calibración	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Regresión Lineal

Anexo B. Análisis Simple de Varianza ANOVA

Anexo C. Fuentes de Incertidumbre

RESUMEN

Se validó el Método Analítico para cuantificar Sulfametoxazol presente en una suspensión oral producido por la Industria Farmacéutica Veterinaria FARBIOVET S.A. mediante Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC), en base a los requerimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud para el control de las Buenas Prácticas de Manufactura. Se preparó las muestras y el estándar en base a los procedimientos establecidos, se usó un estándar de Sulfametoxazol Sigma Aldrich® con una pureza de 99.5%, y se analizó mediante HPLC con un detector UV/VIS a una longitud de onda de 254 nm y una columna Nucleosil C18. Para el desarrollo del proceso de validación se analizó y se valoró estadísticamente diferentes parámetros detallados en un Plan Anual de Validaciones establecido internamente por la empresa, en el cual se encuentra la Linealidad, Selectividad, Precisión, Exactitud, Límites de Detección y Cuantificación, Robustez e Incertidumbre. Se documentó todos los procedimientos en un Protocolo de Validación para identificar de manera clara todos los pasos a seguir durante el proceso. Posterior al proceso de validación se observó que el cromatograma de Sulfametoxazol no presenta picos que interfieran en la cuantificación del activo, se demostró que la concentración del analito es lineal frente a la respuesta del equipo, el método es preciso obteniendo un coeficiente de variación menor al 2%, es exacto ya que el % de recuperación es de 99% a 101%, mediante la robustez se determinó que el volumen de inyección varia significativamente en los resultados obtenidos y la incertidumbre es de 0.18%. Demostrando que el método cumple con los criterios de aceptación establecidos mediante el análisis estadístico de cada uno de los parámetros. Se recomienda la utilización de este método validado por FARBIOVET S.A. para garantizar la calidad del producto.

PALABRAS CLAVE: <SULFAMETOXAZOL> <VALIDACIÓN> <MÉTODO ANALÍTICO><CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)> <FARBIOVET S.A.>

ABSTRACT

The analytical method was validated to quantify Sulfamethoxazole present in an oral suspension produced by the veterinary pharmaceutical industry FARBIOVET S.A. through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) based on the requirements established by the World Health Organization in order to control Good Manufacturing Practices. It was prepared samples and the standard according to established procedures, it was used a Sulfamethoxazole Sigma Aldrich standard with 99.5% purity and it was analyzed by HPLC with a UV/VIS detector at a wavelength of 254 nm and one Nucleosil C18 column. For the development of the validation process, it was analyzed and statistically evaluated various parameters detailed in an Annual Validation Plan internally set by the company, in which the linearity, selectivity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, robustness and uncertainty are suited. All procedures are documented in a Validation Protocol to clearly identify all steps in the process.

After the validation process it was observed that the Sulfamethoxazole chromatogram does not presents peaks that interfere the qualification active, it was shown that the analyte concentration is linear against the response team, the method is accurate obtaining a coefficient or variation less that 2%, is correct because the recovery rate is 99% to 101%, though robustness was determined that the injection volume varies significantly in the results obtained and the uncertainty is 0.18%, showing that the method meets the criteria set by the statistical analysis of each of the parameters. It is recommended the use or this validated method by FARBIOVET S.A. to ensure the quality of the product.

KEY WORDS: <SULFAMETHOXAZOLE> <VALIDATION> <ANALYTICAL METHOD> < HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) > <FARBIOVET S.A.>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador, en su Reglamento Sustitutivo de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para los Laboratorios Farmacéuticos, Registro Oficial 359 del 10 de enero del 2011, en el que adopta oficialmente las “Normas de Buenas Prácticas de Manufactura, Informe 32 de la Organización Mundial de la Salud (OMS)”;

declara que este reglamento es de cumplimiento obligatorio para los laboratorios farmacéuticos instalados en la República del Ecuador que fabriquen, almacenen y maquilen medicamentos, como producto terminado, semielaborado o acondicionado, en empaque primario o secundario.

La Industria Farmacéutica Veterinaria para la implementación y cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura está regulada por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), organismo que se basa en el Informe 32 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro del cual establece la validación como un requisito fundamental de calidad.

Para cuantificar un activo en una determinada formulación que ha sido elaborada en este caso por una Industria Farmacéutica Veterinaria, es necesaria la utilización de métodos analíticos que satisfagan los requisitos establecidos por el laboratorio y que proporcionen resultados válidos, para lo cual se usan métodos normalizados, es decir, los que se encuentran ya establecidos por organismos reconocidos, así también se usan métodos nuevos desarrollados por el mismo laboratorio o a su vez métodos normalizados que han sufrido cambios, los mismos que requieren ser validados, con el fin de garantizar la validez de los resultados de dichos análisis.

Formulación del Problema

El Informe 32 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que la validación de los métodos analíticos es un requisito fundamental para obtener la certificación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). FARBIOVET S.A que ya cuenta con dicha certificación y en cumplimiento de este informe posee un Plan Maestro de Validaciones donde se incluye la Validación del Método Analítico para Valorar Sulfametoxazol mediante HPLC, método que fue desarrollado por el laboratorio, de donde radica la importancia del proceso de validación, garantizando así la calidad de uno de los productos más comercializados por esta empresa como lo es Bactrivet (nombre comercial de la suspensión oral), que cuenta con una venta anual

aproximada de 42034 unidades, que corresponde a 113.544 dólares, y de esta manera posicionarse más en el mercado.

Justificación teórica

Mediante la validación se determina a través de pruebas documentales y evidencia objetiva que un método o un proceso cumple con los requisitos para una aplicación específica prevista, así como la determinación de las fuentes de variabilidad que puedan afectar su desempeño.

La validación de un método analítico principalmente se centra en controlar el funcionamiento combinado del método y el equipo en los procedimientos de análisis ordinarios, para lo cual es importante usar equipos que se encuentren calibrados y/o calificados, y de la misma manera el técnico que desarrolla el proceso debe justificar su calificación técnica para tomar decisiones acertadas a medida que avanza el estudio de validación.

La validación de los métodos analíticos es un requisito fundamental para obtener la certificación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), como garantía de la calidad de los productos farmacéuticos y las especificaciones aplicables a sustancias y formas farmacéuticas. Por lo tanto, la validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones establecidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de un producto determinado. Conscientes de la importancia, entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Farmacopea Europea y la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) consignan la ineludible necesidad de la validación en los procesos analíticos. La validación, por lo tanto, forma parte importante en un programa de aseguramiento de la calidad y es fundamental para una eficiente operación de producción.

Justificación práctica

La molécula de sulfametoxazol presente en el producto veterinario Bactrivet a una concentración de 8g/100 mL de suspensión oral se extrae mediante un diluyente que es el metanol, posterior se realiza una dilución para obtener una concentración de la muestra de 0.1 mg/mL y es cuantificado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a una longitud de onda de 254 nm.

Para la validación de un método se determinan los parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método determinados por

escrito en un procedimiento normalizado de trabajo, a través de un Plan Maestro de Validaciones desarrollado internamente por el laboratorio de la empresa FARBIOVET S.A.

Objetivos

Objetivo general

Validar un método analítico para la valoración de Sulfametoxazol en el producto veterinario Bactrivet presentación comercial (suspensión oral 60 mL) mediante HPLC, producido por la empresa FARBIOVET S.A.

Objetivos específicos

- Determinar los parámetros analíticos de la validación del método para la valoración de Sulfametoxazol.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos y determinar el cumplimiento de las especificaciones para el producto Bactrivet suspensión oral.
- Establecer el Protocolo de Validación de método analítico para determinar la concentración de sulfametoxazol presente en Bactrivet suspensión oral.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

La validación de métodos analíticos se basa en la determinación de los parámetros analíticos mediante un diseño pre-estructurado y esquematizado; su lógica de análisis rige lo confirmatorio, evidencial, y documental que arrojen resultados confiables para la cuantificación de un principio activo.

1.2. Antecedentes de investigación

La Validación de métodos analíticos en el año de 1989 aunque ya era un tema de gran actualidad estaba lejos de su regulación debido a la presencia de muchas opiniones discordantes de cómo llevarla a cabo así como sus necesidades. Estaba instituida la idea de que la validación analítica era un trámite burocrático, que no tenía mucha o ninguna implicación del laboratorio y que simplemente era necesario incluirla en los dossiers de Registro.

Posteriormente se realizaron diversos estudios durante años y fue recomendado por diferentes organismos de carácter oficial; como la Federal Drug Administration (FDA) quien en 1976 determina el primer concepto en la revisión de las normas correctas de fabricación, quien siete años después, establece criterios de tipo informativo, que orientan en un sentido más amplio hacia la validación de procesos.

La validación de métodos analíticos, junto con otras actividades comprendidas en el aseguramiento de la calidad, permiten otorgar la calidad y la confianza necesaria en los resultados obtenidos de los millones de análisis que se realizan cada día en diferentes ámbitos. (Medina & Berrocal, 2008, p.18)

Se validan métodos analíticos para cumplir con requisitos de las normas internacionales como son las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en Industria Farmacéutica, la Organización Internacional de Normalización (ISO) 17025 que se refiere a la Acreditación de Laboratorios de Ensayo y de Calibración. (Arriola, 2012, p. 8)

El descubrimiento y uso de la penicilina impulsó la investigación de los antibióticos, pero inicialmente en 1887, Pasteur ya observó el bacilo del carbunco que inhibía en presencia de contaminantes del aire. Posterior observó que *Pseudomonas aeruginosa* antagonizaba al *Bacillus anthracis* de donde fue elaborada la pioquinas, cuyo efecto es producir lisis en algunas bacterias. De esta manera surgió uno de los inicios de la quimioterapia.

A lo largo del tiempo se han descubierto cientos de antibióticos, pero no todos son de interés práctico y otros aún siguen en experimentación. En 1929, Alexander Fleming comprobó que un caldo que contenía un moho contaminante había desarrollado propiedades antibacterianas al observar que causaba lisis en un cultivo de *Staphylococcus*. Este moho puede ser considerado el primer antibiótico identificado y tomó el nombre de penicilina, debido al género de hongos que lo producen, *Penicillium*. Pero a partir de 1940, fue cuando se inició la búsqueda de microorganismos productores de antibióticos. (Paredes, 2010, p. 9)

En 1942 Waksman y su equipo a partir de un germen del suelo que inhibía a microorganismos Gram negativos, obtuvieron la estreptomycin, y después apareció la Oxitetraciclina un antibiótico más eficaz.

El cloranfenicol que inicialmente se lo conoció como cloromicetina, fue aislado a partir de un actinomiceto llamado *Streptomyces venezuelae*. Éste fue el primer antibiótico que se produjo en forma sintética en grandes cantidades, debido a que es un derivado de una molécula sencilla, el ácido dicloroacético. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 128)

La sulfanilamida fue la primera sulfamida sintetizada en 1908 por Gelmo pero su actividad antibacteriana se descubrió un cuarto de siglo más tarde y se consideraron las primeras drogas empeladas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas.

Este descubrimiento dio lugar a la quimioterapia microbiana debido a que estas sustancias se insertan en el metabolismo del microorganismo inhibiendo sus funciones y aunque han perdido algo de interés por la presencia de los antibióticos que poseen un espectro antimicrobiano más extendido, las sulfamidas presentan alto interés en veterinaria, por lo que su uso es muy amplio y variado.

Estas drogas se pueden determinar cuantitativamente en todo tipo de matriz, mediante un gran número de métodos, siendo los instrumentales los más utilizados, dentro de los cuales los métodos espectroscópicos de absorción en el ultravioleta – visible, junto con los cromatográficos, han permitido analizar la mayoría de las sulfamidas como el sulfametoxazol.

Los métodos cromatográficos más utilizados para el análisis de sulfamidas, se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), aunque también se encuentran reportes bibliográficos del uso de cromatografía de gases (CG) y la cromatografía en capa fina (CCF). (Guzmán, 2005, p. 5)

FARBIOVET es una empresa relativamente joven, que cuenta con productos que se comercializan en el país así como en el exterior. Se especializa en la producción de fármacos veterinarios innovadores que permiten asociar procedimientos terapéuticos, los mismos que se reflejan en la salud animal. Son fármacos veterinarios de alta eficiencia y con excelente relación costo beneficio.

FARBIOVET S.A. en su política de calidad cita: *“Somos una organización orgullosamente ecuatoriana dedicada a investigar, desarrollar, manufacturar y comercializar productos farmacéuticos y biológicos veterinarios, cumpliendo reglamentos y normas legales, encaminados hacia la excelencia, administrada por objetivos, mejorando continuamente sus procesos, con el propósito de satisfacer las necesidades de nuestros clientes”, la misma que engloba todas sus actividades y responsabilidades como una Industria Farmacéutica Veterinaria comprometida con el mejoramiento continuo*”. (Farbiovet S.A., 2015.)

1.3. Bases Teóricas

1.3.1. Validación

Básicamente la validación se fundamenta en especificar e implementar, aprobar y documentar. Proceso mediante el cual se verifica que los resultados proporcionados por determinado método sean confiables, para comprobar esto se realizan análisis estadísticos con los que se comprueba que el método a validar cumple con los fines esperados. Una validación debe realizarse en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. El alcance de la validación debe establecerse en base a los requerimientos del método. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 21) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 45)

Según las Normas de Correcta Fabricación validación es la obtención de pruebas de que cualquier procedimiento o actividad produce en realidad el resultado previsto.

La definición analítica de validación determina la evidencia documental de que un procedimiento analítico, produce resultados válidos, que se encuentran dentro de las

especificaciones y atributos de calidad establecidos al inicio del proceso de validación y presentan un alto grado de seguridad. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 46)

Otras definiciones relacionadas con el proceso de validación son la calificación y la calibración.

1.3.2. Calificación

Operación mediante la cual se comprueba que un equipo se encuentra en correcto funcionamiento y que emite los resultados esperados. La calificación requiere que los equipos sean instalados correctamente e inspeccionados, calibrados periódicamente, según procedimientos escritos.

1.3.3. Calibración

Conjunto de operaciones que bajo condiciones establecidas determinan la relación de los valores emitidos por el sistema de medición con los valores de un patrón de referencia.

En base a estos términos se determina que un método debe ser validado y un equipo debe ser calificado. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 47)

1.3.4. Tipos de Métodos Analíticos para la validación.

1.3.4.1. Métodos Normalizados

Método analítico que ha sido desarrollado por un organismo de normalización o a su vez desarrollados por organismos reconocidos y dichos métodos son aceptados por los técnicos correspondientes. (Arriola, 2012, p. 9)

1.3.4.2. Método normalizado con una modificación significativa

Métodos internos que han sido desarrollados en el laboratorio, métodos usados tradicionalmente que no son normalizados pero se realizan a partir de un método normalizado. (Arriola, 2012, p. 9) (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 23)

1.3.4.3. Métodos Desarrollados por el Laboratorio

Métodos analíticos no normalizados, no se encuentran en normas, colecciones, ni en publicaciones de terceros, son desarrollados por el laboratorio.

Se validan los Métodos No Normalizados, los Métodos desarrollados por el Laboratorio, y los Métodos Normalizados que han sido modificados para ser usados con otro alcance al que fue predestinado. (Arriola, 2012, p. 9)

1.3.5. División de los Métodos según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11 03 39: 06.

1.3.5.1. Categoría I

Pruebas cuantitativas. Determinan la cantidad de principio activo, mediante procedimientos químicos o microbiológicos que cuantifican el analito presente en la muestra a analizar. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2010, p. 5)

1.3.5.2. Categoría II

Ensayos para determinar el contenido de impurezas y establecen valores límites para el control de las mismas. Estos ensayos pueden ser cuantitativos o cualitativos, es decir, establecen la presencia o ausencia de impurezas en la muestra y si se encuentran o no dentro de los valores establecidos. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2010, p. 5)

1.3.5.3. Categoría III

Pruebas fisicoquímicas que especifican las características del desempeño de un medicamento. Los parámetros para esta validación son diferentes a los de los otros ensayos, aunque se pueden incluir. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2010, p. 5)

1.3.5.4. Categoría IV

Ensayos de identificación. Aseguran la identidad de un analito presente en la muestra. Esta prueba se realiza comparando una propiedad de la muestra a analizar con un estándar de referencia. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2010, p. 5)

1.3.6. Tipos de Validación

1.3.6.1. Validación Retrospectiva

Se realiza una recopilación de datos experimentales disponibles sobre determinado método, después de ordenar y seleccionar los datos determinar los parámetros de validación y evaluar si son aceptados en base a las especificaciones establecidas para la validación del método en cuestión. Cuando no se obtiene la suficiente cantidad de datos para realizar la evaluación estadística, o simplemente cuando el método es nuevo, se realiza una Validación Prospectiva. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 25)

1.3.6.2. Validación Prospectiva

En este proceso se generan los datos experimentales a través de la realización de los análisis correspondientes. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 25)

Los métodos analíticos susceptibles de ser validados son los ensayos de identificación, ensayos para determinar el analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica, ensayos para determinar características farmacotécnicas inherentes, ensayos de límite y cuantificación de impurezas, ensayos para determinación de analitos en productos naturales, ensayos microbiológicos. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 47)

1.3.7. Verificación

Consiste en confirmar mediante la determinación de evidencia objetiva de que un método normalizado cumple los requisitos establecidos descritos en una norma. (Arriola, 2012, p. 11)

Se realiza una verificación o validación menor cuando se trate de Métodos Normalizados, que se usan con diferente propósito a los que fueron establecidos, modificaciones, métodos previamente validados que han sufrido alguna alteración significativa por la que se requiera volver a validar como cambios en los equipos o sus componentes, cambio de matriz o concentración del analito. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 30)

Mediante la verificación de los métodos normalizados el laboratorio comprueba que los cambios que puede sufrir la técnica no afectan en el desempeño y confiabilidad de los resultados de ensayos, con lo que se comprueba que son adecuados para el fin propuesto en cada caso. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 30)

1.3.8. Validación de un método

Es el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de aquellas variables que podrán modificar estas características y a qué grado. (Guía Eurachem, 1998, p. 17)

- Es aplicable cuando un método se desarrolla sin tener en mente un problema analítico en particular.
- Es aplicable cuando el método se está desarrollando con un propósito específico.

1.3.8.1. Cuando deben ser validados los métodos

Cuando sea necesario verificar que los parámetros de desempeño del método son adecuados para el uso de un problema analítico en particular:

- Cuando se desarrolle un nuevo método para un problema en particular.
- Un método establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Cuando se establece que un método está cambiando con el tiempo.
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos: un método nuevo y un método de referencia. (Guía Eurachem, 1998, p. 18)

Para iniciar el proceso de validación es necesario identificar el analito de interés, se debe disponer de una formulación definida ya que los cambios incluso en los excipientes afectan el proceso analítico, definir todos los detalles del procedimiento con el fin de asegurar que las condiciones descritas son las correctas para obtener los resultados esperados. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 49)

1.3.8.2. Requisitos para el proceso de validación

- El personal que va a realizar el proceso es uno de los factores más importantes, se debe disponer de suficiente personal técnico, capacitado y organizado.
- Las instalaciones deben estar en condiciones idóneas en cuanto al espacio físico, dimensiones, diseño, ubicación, etc.

- Los aparatos deben disponerse en cantidad suficiente con la capacidad adecuada para responder a las necesidades de cada uno de los ensayos. Deben estar limpios y en buen funcionamiento con el fin de que garanticen resultados fiables. Se realizarán las comprobaciones, calibraciones, calificaciones de los equipos e instrumentos de medición.
- Los reactivos deben prepararse por técnicos calificados siguiendo procedimientos establecidos y aprobados.
- Es importante trabajar con patrones de referencia primarios originales (USP, EP, etc.) o a su vez patrones de referencia secundarios de trabajo. Las muestras para los ensayos deben ser mezclas o diluciones que se preparen en el mismo laboratorio, representativas y desarrolladas en base a procedimientos escritos y aprobados. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 50)
- Disponer de un plan maestro de validaciones escrito y aprobado. (Arriola, 2012, p. 12)

1.3.9. Plan de Validación o Protocolo de Validación

Es un documento tipo protocolo en el que se delimitan previamente las pruebas o parámetros de validación establecidos en base a las necesidades del método. Este documento contiene el alcance de la validación, en el que se especifica el método, el analito a determinar, los requerimientos; también contiene el diseño experimental, donde se establece que muestras van a ser analizadas, blancos de matriz, patrones de referencia, se delimitan los parámetros y pruebas a desarrollar, documentos asociados a cada análisis, criterios de aceptación para cada parámetro de validación, materiales, reactivos y equipos a usarse y los responsables del proceso y de la realización y aprobación de este documento.

Cualquier variación en la estructura del protocolo de Validación, deberá ser documentada durante el proceso. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 25)

1.3.10. Desarrollo de Pruebas de Parámetros de Validación

Los parámetros del desempeño para la validación de un método analítico indican su grado de calidad mediante características o capacidades cuantificables del método. (Arriola, 2012, p. 13)

El analista debe conocer el procedimiento para el desarrollo de los ensayos, así como el número de análisis que se especifican en el Protocolo de validación. Verificar que el personal esté capacitado, así como que los equipos usados para los análisis se encuentren calificados y en correcto funcionamiento. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 26)

Los parámetros de validación a realizarse son los siguientes:

- Selectividad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límite de Detección y Cuantificación
- Robustez
- Incertidumbre

En base a los resultados obtenidos desarrollar los análisis estadísticos correspondientes para cada ensayo, para lo cual se puede utilizar plantillas de cálculo en Excel.

1.3.10.1. Selectividad

Determina el grado en el que un método puede cuantificar al analito en presencia de interferencias y que la señal producida en la etapa de medición se le atribuye únicamente al analito de interés y no a los agentes interferentes o productos similares que con frecuencia se encuentran en la matriz que se va a analizar. La selectividad va a depender de la efectividad de la etapa de medición. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 26) (Guía Eurachem, 1998, p. 20)

Con el estudio de este parámetro se garantiza la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias, las que pueden inhibir la confirmación del analito, también pueden incrementar aparentemente la concentración al contribuir a la señal atribuida a él, (o suprimir la concentración del analito si contribuyen con una señal negativa). (Guía Eurachem, 1998, p. 20)

Este parámetro se desarrolla mediante el estudio de la capacidad de medir las señales producidas por el analito de interés comparándolo con las señales proporcionadas por el blanco de matriz, testigos reactivos, estándares de referencia. Si se encuentra variaciones significativas deben ser detectadas y de ser posible deben ser eliminadas. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 26) (Guía Eurachem, 1998, p. 20)

Cuando se crea que el analito no posee interferencias, la selectividad comprueba la capacidad para medir dicho analito en comparación con otros métodos. (Guía Eurachem, 1998, p. 20)

La presencia de interferencias puede producir una identificación equivocada (falsos positivos) y puede distorsionar la respuesta del analito, sin embargo, para un método de control de calidad la existencia de alguna interferencia se podría aceptar si es conocida y de magnitud aceptable.

La selectividad debería ser determinada al inicio del proceso de validación, para conocer si la respuesta debe únicamente al analito de interés y así continuar con el proceso. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 52)

Especialmente cuando se trabaja con métodos cromatográficos se requiere que el método sea lo más selectivo posible, y si presentan otros componentes que tengan la mínima influencia posible sobre el resultado. El estudio de la selectividad está vinculado al origen de la muestra, la preparación y las condiciones instrumentales, por lo que cualquier cambio de estas condiciones requiere que se vuelva a realizar el estudio. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 52)

Determinación de la Selectividad.

Consiste en comparar los resultados del análisis de muestras con y sin analito, en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y excipientes.

En caso de que se observen interferencias, se puede evaluar el nivel con el grado de discrepancia entre los replicados en presencia o ausencia de interferencias, para lo cual el porcentaje de discrepancia debe ser menor al 3%. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 52)

1.3.10.2. Linealidad

La Linealidad determina la capacidad del método analítico para generar una respuesta directamente proporcional de la cantidad de analito que se va a determinar en la muestra y la concentración del mismo dentro de un rango establecido. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 53)

La recta de calibrado conocida como función respuesta determina el rango lineal mediante la realización de un gráfico de la concentración versus la respuesta.

En el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y determinar cuantitativamente el rango lineal, con lo que se realiza la curva de calibración. Se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación, siempre que sea posible. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 54)

La linealidad establece como criterio de aceptación el coeficiente de correlación, que indica el grado de relación entre la variable X correspondiente a la concentración y la variable Y que corresponde a la respuesta de la curva de calibración. Para valorar un principio activo se recomienda evaluar en un rango de 80 – 120 %. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 30) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 54)

El coeficiente de correlación alcanza valores de -1 y 1, el valor máximo indica una correlación con una pendiente positiva entre las dos variables, cuando es 0 no existe correlación, independencia de las variables. Para una curva de calibración el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.995, en el caso de trazas se admite un valor mayor o igual a 0.99. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 30)

Se puede realizar una evaluación estadística de prueba *t-Student*, como un mejor indicador del modelo lineal para realizar una evaluación de curva de calibración global.

Se calcula un valor de t con n-2 grados de libertad y se compara con el valor tabulado de t para el nivel de confianza requerido ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un “n” que depende de los niveles de calibración. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 31)

Para determinar la linealidad se analizan muestras que pueden prepararse a partir de estándares de concentración conocida, o bien a partir de un lote de concentración conocida del producto terminado.

Con los resultados del estudio se elabora una tabla donde se relaciona los valores de *x* o variable independiente y los valores de *y* o variable dependiente, la relación se expresa como una recta de regresión del tipo $y=b*x+a$. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 55)

Evaluación estadística de la Linealidad

La determinación de la linealidad necesita una confirmación estadística.

Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.

En la recta de regresión $y = b * x + a$, **x** = concentración, **y** = respuesta, **b** = valor de la pendiente y, **a** = término independiente.

La pendiente **b** está relacionada con la sensibilidad del método de tal forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad. El término independiente **a**, u ordenada en el origen, es la

intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 56)

Coefficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²).

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable x (concentración) y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a uno quiere decir que hay una probabilidad elevada de que exista correlación. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendado para el coeficiente de correlación es ≥ 0.995 .

El cálculo de r no justifica por si sola la linealidad porque la información es limitada, por lo que r² coeficiente de determinación expresa la proporción de la variación total de y, aportando una mayor significación estadística. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 56)

Análisis de Varianza: ANOVA

Para realizar una ANOVA se debe cumplir con la Homogeneidad de varianzas y la Normalidad de los residuales. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 57)

Homogeneidad de varianzas

Se comprueba realizando el test de Cochran, que indica si la concentración influye en la variabilidad de los resultados; es habitual que el test se efectúe aun cuando el intervalo de concentraciones no es amplio.

Se calcula el valor de G_{exp} de la siguiente forma:

$$G_{exp} = \frac{s^2_{m\acute{a}xima}}{\sum s_i^2}$$

s_i^2 = varianza de cada grupo K

$s^2_{m\acute{a}xima}$ = varianza máxima de los K grupos

G_{tablas} (α=0.05, K=5, n=3) = 0.68. En base a la tabla de la Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran

Las varianzas no deben ser estadísticamente diferentes.

Si la homogeneidad de varianzas no cumple puede deberse a una variabilidad mayor de uno de los extremos del rango, se puede analizar a diferentes niveles de concentración para disminuir la variabilidad. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 57)

Normalidad de los residuales: se comprueba aplicando el test de normalidad. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 57)

Test de la Verificación de la Pendiente o de Linealidad

Se realiza mediante el procedimiento de la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente en la que se comprueba que existe una pendiente significativamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0.05 mediante una prueba de t de Student. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 58)

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad S_b \text{ se obtiene a partir del cálculo de la varianza residual } s_{y,x}^2$$

Posterior se calculan los intervalos de confianza a partir de la expresión: $b \pm t * S_b$, donde t es el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación α 0.05. Los intervalos de confianza no deben incluir el cero. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 58)

Test de Proporcionalidad

Permite determinar si la variable independiente es significativamente distinta de cero y si la recta pasa por el origen de las coordenadas. Este test se realiza con una prueba de significación t de Student (n-2 grados de libertad, $\alpha = 0.05$). (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 58)

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} \quad S_a \text{ se obtiene a partir del cálculo de la varianza residual } s_{y,x}^2$$

Los intervalos de confianza $a \pm t * S_a$, debe estar incluido el cero. (Barahona, 2012, p. 2)

1.3.10.3. Precisión

Expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas a partir de una misma muestra en las condiciones prescritas, es decir es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 59)

La precisión permite conocer la variabilidad causada por diferentes errores innatos del método analítico, dichos errores muchas veces no pueden ser controlados, lo que conduce a que muestras iguales, en las mismas condiciones no producen resultados idénticos.

Se expresa como repetibilidad y reproducibilidad y calcula como la desviación estándar de los resultados. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 59)

Repetibilidad

Es la precisión más pequeña esperada, determina la variabilidad de los resultados de análisis cuando el método se determina en las mismas condiciones, mismo laboratorio, mismo operador, mismo equipamiento en un corto intervalo de tiempo, es decir los resultados que se esperan cuando los análisis se realizan por duplicado. Se determina mediante el cálculo la desviación estándar y el coeficiente de variación que permite observar la diferencia entre análisis en condiciones de repetibilidad. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 35) (Guía Eurachem, 1998, p. 25)

La concentración del analito puede influir en la repetibilidad del método, ya que cuando disminuye dicha concentración la desviación estándar de las respuestas aumenta.

El cálculo se realiza obteniendo el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) de las respuestas obtenidas, el cual debe ser menor o igual al 2% y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 60)

Reproducibilidad

Es la medida de precisión más grande esperada. Se desarrolla como precisión intermedia, los resultados de los análisis se determinan en las mismas condiciones del método, por el mismo laboratorio, diferentes analistas, distintos equipos, en horarios prolongados y se calcula mediante la desviación estándar con lo que se puede confirmar si la diferencia entre análisis es significativa en condiciones de reproducibilidad. (Arriola, 2012, p. 14) (GONZÁLEZ, 2006, p. 30)

Se expresa como el coeficiente de variación (CV) o Desviación estándar relativa (RSD), que debe ser menor o igual al 2%, considerando cada resultado independientemente. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 60)

1.3.10.4. Exactitud

Determina el grado de concordancia o proximidad entre el resultado del ensayo y el valor de referencia o valor verdadero. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 37) (Guía Eurachem, 1998, p. 26)

Se determina mediante el método de comparación de los resultados de un estándar o Material de Referencia Certificado con el valor declarado.

Se calcula mediante el porcentaje de Recuperación, que permite observar el rendimiento analítico, puede estar entre 98 y 102% del valor teórico o 2% de error relativo. (Arriola, 2012, p. 15)

1.3.10.5. Límites de Detección y Cuantificación

Cuando se usan métodos instrumentales es posible que éstos permitan detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas (trazas) de analito. De ahí que los métodos estadísticos son de mucha importancia para la determinación de los límites de detección y de cuantificación. (Miller, & Miller, 2002, p. 125)

Límite de Detección.

Este parámetro permite determinar la concentración más pequeña del analito que puede ser detectada por el método en condiciones confiables, cuando se realicen mediciones para niveles bajos del analito (análisis de trazas), aunque no necesariamente puede ser cuantificado con precisión y exactitud. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 61)

Se puede definir como la concentración de una señal provista por un instrumento significativamente diferente a la señal del blanco; pero principalmente se la puede definir como la concentración de analito con una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. (Miller, & Miller, 2002, p. 126)

Límite de Cuantificación

Determina el nivel más bajo de concentración del analito cuantificable, este parámetro tiene fundamental interés para determinar concentraciones bajas de analito. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 61)

También se lo denomina como límite de determinación, y es el límite inferior para cuantificar de forma precisa, se expresa como la concentración de analito con una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco. (Miller, & Miller, 2002, p. 126)

La justificación para que el límite de Detección sea tres veces la desviación estándar del blanco y que el Límite de Cuantificación diez veces la desviación estándar del blanco se establece de acuerdo a los intervalos de confianza de una distribución normal. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 61)

La manera de obtener Y_B y S_B para los dos límites es utilizar la recta de regresión para la calibración, donde cada punto en la representación gráfica tiene una variación que está distribuida normalmente con una desviación estándar establecida por $S_{y/x}$, por lo cual es adecuado usar $S_{y/x}$ en lugar de S_B para determinar los límites, mientras que para la determinación de Y_B se puede usar el valor de a , que sería la propia señal del blanco. (Miller, & Miller, 2002, p. 127)

1.3.10.6. Robustez

Determina la fiabilidad o estabilidad del método en un uso normal; es la capacidad de un método analítico de no ser inalterado por variaciones intencionales de los parámetros del procedimiento, dichas variaciones deben ser identificadas para determinar la influencia y de esta forma medir la consecuencia en el desempeño del método. Tiene como finalidad identificar fácilmente las variables susceptibles de producirse que deben ser controladas cuando se esté desarrollando el método analítico y determinar las condiciones óptimas con las que se obtienen resultados confiables en los análisis de rutina. Cuando el método es poco afectado frente a modificaciones analíticas quiere decir que dicho método es más robusto. Las condiciones que pueden afectar al método son los analistas, el cambio de equipos, diferentes reactivos, el pH, temperatura, tiempo de reacción de la muestra, estabilidad, entre otros. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 38) (Guía Eurachem, 1998, p. 27)

Para determinar la robustez hay que establecer los parámetros que se van a medir en cada ensayo y posterior a esto se debe definir los factores de variación que pueden ser cuantitativos o cualitativos. Por razones de interpretación estadística es conveniente evaluar un número de factores mínimo de 3 (A, B y C) y mínimo de 8 experimentos. Mediante el análisis factorial se establece la influencia de los tres factores así como de sus interacciones dos a dos, pero también pueden interactuar los tres. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 62)

Cada uno de los factores posee un signo que corresponde a la desviación diseñada del factor con respecto a su valor nominal, mientras que las interacciones dos a dos o entre los tres factores resulta del producto algebraico de los signos de cada factor. Una vez obtenidos los resultados, se realiza la evaluación estadística que determina que factor o que interacción tiene mayor influencia, o es más significativa, para lo cual se calcula el intervalo de confianza para cada caso. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001, p. 62)

1.3.10.7. Incertidumbre

En la incertidumbre se determina los efectos reconocidos que pueden intervenir en los resultados. (Guía Eurachem, 1998, p. 30)

La determinación de la incertidumbre incluye principalmente 4 pasos:

Fuentes de Incertidumbre

Primero un método validado debe determinar las fuentes de Incertidumbre presentes en el análisis, que se puede expresar bajo un diagrama de espina de pescado, en el que se especificará cada una de las fuentes de incertidumbre; dentro de las cuales se debe considerar la precisión del método en un periodo de tiempo largo (reproducibilidad), muestreo, efectos de la muestra, incertidumbre del material de referencia, incertidumbres de la calibración de los equipos (mientras más calibraciones más pequeñas serán las incertidumbres), reactivos usados, analista, condiciones de medición, condiciones ambientales (temperatura) y otros como el método, tablas (por ejemplo las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 45) (Guía Eurachem, 1998, p. 30)

Incertidumbre Estándar: $u(y')$

Posterior como segundo paso se analiza las incertidumbres estándar que se expresan como tipo A y B presentes en el método. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 46)

• Evaluación de incertidumbre tipo A

Evalúa un componente mediante análisis estadísticos de los valores de medición relacionados con fuentes de error aleatorios, se pueden realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 47) (GONZÁLEZ, 2006, p. 41)

- **Evaluación de incertidumbre tipo B**

Esta incertidumbre no se determina estadísticamente se asocian a los errores de tipo sistemático, se valoran mediante datos del instrumento, especificaciones, calibraciones, datos subjetivos, mediante información de un certificado de calibración, etc. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 48) (GONZÁLEZ, 2006, p. 41)

Incetidumbre Estándar Combinada: $u_c(y)$

Como tercer paso para la determinación de la incertidumbre se combinan las incertidumbres estándares tipo A y B expresadas como desviación estándar. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 49) (GONZÁLEZ, 2006, p. 42)

Reglas para el cálculo de la incertidumbre combinada

Regla 1: Sumas y restas: $y: a + b + c + \dots$

$$u(y) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + u(c)^2 + \dots}$$

Regla 2: Productos y cocientes: $y = abc$ o $y = a/bc$

$$\frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{u(a)}{a}\right]^2 + \left[\frac{u(b)}{b}\right]^2 + \left[\frac{u(c)}{c}\right]^2}$$

Regla 3: Exponentes: $y = a^n$

$$\frac{u(y)}{y} = n \frac{u(a)}{a}$$

Incetidumbre expandida: U

Finalmente se determina la incertidumbre expandida, que proporciona un intervalo dentro del cual se cree que está el valor del mesurando, cuando por razones de seguridad se necesite expresar la incertidumbre con un alto nivel de confianza; consiste en multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de $K=2$ para un intervalo de confianza de un 95%. El resultado obtenido corresponde a un intervalo de " $a \pm 2u$ " dentro del cual se

encontraría el valor real, representando un valor de confianza del 95%. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 50) (GONZÁLEZ, 2006, p. 43)

$$U = K \cdot u_c(y)$$

K= factor de seguridad o de cobertura. Para un nivel de confianza del 95.45%, se considera un valor de K igual a 2. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 50) (GONZÁLEZ, 2006, p. 43)

En el Centro Nacional de Metrología (CENAM) - México se establece que los resultados de las mediciones para la expresión de la incertidumbre deben expresarse con un nivel de confianza no menor a 95%, con los valores de $p = 95.45\%$ se obtiene un valor de $K = 2.00$, correspondiente a una distribución normal “t”. (Schmid & Lazos, 2000, p. 20)

1.3.11. Evaluar Resultados de la Validación

En el protocolo de validación se establecen criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de validación, se debe evaluar en cada ensayo si los resultados obtenidos cumplen con dichos criterios para determinar la aceptabilidad del método analítico. (Instituto de Salud Pública Chile, 2010, p. 52)

1.3.12. Medicamento de Uso Veterinario

Sustancia o combinación de sustancias que tienen propiedades curativas o preventivas para las enfermedades animales o que se administre al animal para modificar o reintegrar sus correctas funciones fisiológicas. (Barahona, 2012, p. 4)

1.3.13. Formas Farmacéuticas Líquidas

Estas formas líquidas son disoluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes que contienen uno o más principios activos en un vehículo apropiado. (Barahona, 2012, p. 11)

Suspensiones

Las suspensiones presentan un principio activo insoluble en el vehículo y cuyas partículas se encuentran suspendidas en el mismo, estos preparados tienden a dividirse en fases cuando se encuentran en reposo y se reconstituye mediante agitación. (Barahona, 2012, p. 12)

1.3.14. Antimicrobianos

1.3.14.1. Quimioterapia

En la quimioterapia únicamente se usa como tratamiento productos químicos con efectos antagónicos sobre los organismos que producen ciertas enfermedades, mediante la inhibición de los procesos metabólicos que son importantes para su vida. (Paredes, 2010, p. 10)

1.3.14.2. Definición

Los antibióticos son productos de diferentes bacterias, hongos o actinomicetos, que inhiben el crecimiento o pueden destruir otros microorganismos.

Los antibióticos naturales son sustancias de bajo peso molecular producidos por seres vivos, y la modificación artificial de éstos producen los antibióticos semisintéticos, que a pequeñas concentraciones tienen efectos bactericidas y bacterioestáticos. (Paredes, 2010, p. 10) (Sumano & Ocampo, 1997, p. 128)

Mayor parte de antibióticos resultan del metabolismo secundario de microorganismos procariotas (*actinomicetos*, *Bacillus*, etc.) o eucariotas (hongos de los géneros *Penicillium*, *Cephalosporium*, etc.). (Paredes, 2010, p. 10) (Sumano & Ocampo, 1997, p. 128)

Se determina que un antibiótico debe reunir ciertas propiedades como que debe ser eficaz y selectivo mayormente bactericida que bacteriostático, que no produzca resistencia, que su eficacia no sea reducida o que no se destruya por proteínas plasmáticas o enzimas proteolíticas, que tenga una acción específica, de baja toxicidad, y que sea de alta penetrabilidad. (Paredes, 2010, p. 12) (Sumano & Ocampo, 1997, p. 131)

Un antimicrobiano útil en el tratamiento de infecciones, ejerce sus efectos en los microorganismos invasores, sin dañar las células del huésped, generando como primer resultado un decremento en la velocidad de multiplicación bacteriana, pero a la vez requiere la intervención de los mecanismos de defensa del huésped. (Paredes, 2010, p. 12) (Sumano & Ocampo, 1997, p. 131)

1.3.14.3. Clasificación de los antibacterianos

Los antibacterianos se clasifican por su mecanismos de acción como agentes que alteración de la pared celular, sustancias que alteran la permeabilidad de la membrana celular bacteriana,

agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos o producen daño al DNA o RNA y agentes que inhiben de la síntesis proteínica. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 133)

Otras clasificaciones de los antibacterianos o quimioterapéuticos se basan en su eficacia relacionada con el espectro de los microorganismos que inhiben. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 134)

Según su origen se puede clasificar, tomando en cuenta si son producidos a partir de hongos, bacterias o actinomicetos, pero es importante clasificarlos según su espectro antibacteriano, de espectro amplio los que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, y sobre microorganismos más inferiores como hongos y rickettsias, los de espectro intermedio que actúan contra una gran variedad de bacterias, pero no abarcan la mayor parte de las Gram positivas y Gram negativas a la vez. Los antibióticos de espectro reducido actúan sobre unos cuantos microorganismos Gram negativos o Gram positivos. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 135)

1.3.15. Sulfonamidas

Agentes quimioterapéuticos que fue el primero en usarse eficazmente en la prevención y cura de las infecciones bacterianas y hasta la actualidad siguen siendo los antibacterianos más utilizados en la veterinaria. Las sulfonamidas son derivados de la sulfanilamida, a la que se añaden o se le sustituyen varios grupos funcionales al grupo amino, cambios que producen compuestos con distintas propiedades físicas, químicas, farmacológicas y antibacterianas. Las sulfonamidas son bacteriostáticos, más eficaces en las primeras etapas de las infecciones agudas. (Paredes, 2010, p. 15)

1.3.15.1. Historia

Un cuarto de siglo antes que se use a las sulfonamidas contra infecciones bacterianas, Gelmo, en 1908 las obtuvo por primera vez. En 1919, Heidelberger y Jacobs observaron efectos bactericidas in vitro de ciertos compuestos asulfamídicos que poseen en su estructura p. aminobencensulfonamida combinados con la hidrocupreína. En 1935, en Alemania, Gerhard Domagk, G. Farbenindustrie, descubrió el prontosil, compuesto diazótico eficaz en la protección contra varias cepas letales de *Streptococcus haemolyticus*. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 137)

Los químicos del Instituto Pasteur demostraron que el complejo p.aminobencensulfonamida (sulfanilamida) era la parte antibacteriana del prontosil.

Se sintetizó muchos derivados de la sulfanilamida con acción antibacteriana más amplia o diferente. Se estudió más de 5400 sustancias relacionadas, de las cuales más de 120 han tenido

importancia terapéutica. Las actuales preparaciones de sulfonamidas, mejoradas con diaminopirimidinas (trimetoprim), han destacado por su potencia, espectro e inocuidad. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 139)

1.3.15.2. Características fisicoquímicas

Las sulfonamidas son derivados de la sulfanilamida (estructuralmente similar al PABA), que da origen de diferentes compuestos con mayor potencia, mayor espectro e índices terapéuticos más amplios que dependen de las sustituciones o variaciones en el grupo amida, siendo el núcleo p.aminobencensulfonamida la base de todas las sulfonamidas. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 140)

Son compuestos que se comportan como ácidos orgánicos débiles y forman sales con las bases fuertes. Generalmente, tienen pH de 10.5-12.5. La solubilidad es mayor conforme aumenta el pH; lo que quiere decir que son más solubles en medios alcalinos que en medios ácidos o neutros; poco solubles en agua.

Tienden a cristalizarse en la orina, especialmente en animales sobredosificados o deshidratados, pero las combinaciones de sulfonamidas permiten mayor solubilidad, disminuyendo las posibilidades de daño renal. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 141)

1.3.15.3. Mecanismo de acción

Actividad antimicrobiana versátil contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Produce un efecto bacteriostático donde los mecanismos de defensa del huésped son los que causan la eliminación de la infección, pero las combinaciones de sulfonamidas con trimetoprim pueden tener un efecto bactericida. (Paredes, 2010, p. 16)

El ácido paraaminobenzoico (PABA) es una sustancia necesaria para el crecimiento de algunas bacterias patógenas, y es análoga del núcleo químico de las sulfonamidas, que a una elevada concentración reemplazan al PABA produciendo la inhibición del crecimiento bacteriano, deteniéndose el desarrollo de la infección, así como pueden inhibir las respiraciones aerobias y anaerobias de las bacterias. (Paredes, 2010, p. 16)

1.3.15.4. Efectos adversos

Se presenta una toxicidad crónica a nivel renal después de varios días de tratamiento, debido a la insuficiencia en la excreción, lo que conlleva a una cristaluria y obstrucción que va a depender de la solubilidad del compuesto, volumen de la orina, cantidad de sulfonamida que se

excreta, pH de la orina, etc; lo que produce que las sulfonamidas precipitadas formen cristales, los que perforan y desgarran las células del aparato urinario y pueden llegar a formar cálculos obstruyendo los túbulos colectores, la pelvis renal o los uréteres. Estos efectos se pueden disminuir aumentando el consumo de agua y alcalinizando la orina con bicarbonato vía oral, o incluso parenteral. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 143)

En perros, las dosis altas estimulan el SNC, y los síntomas son carreras sin fin, parálisis espástica, convulsiones, depresión de los reflejos condicionados, anorexia, diarrea, náusea y vómito. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 143)

La sulfonamidas potencializadas con trimetoprim disminuyen la duración de los tratamientos con lo que se hace casi imposible la aparición de signos de toxicidad, además se reduce los tiempos de espera después del tratamiento para la utilización comercial de huevos. . (Paredes, 2010, p. 17)

1.3.15.5. Excreción

Principalmente se excretan por los riñones, y las que se absorben se eliminan poco por las heces. Se eliminan en pequeñas cantidades en la bilis, jugos pancreático, gástrico e intestinal, saliva y leche. Se ha informado sobre la excreción de sulfonamidas en el huevo (albúmina y yema) y en tejido comestible de pollos. (Paredes, 2010, p. 17)

1.3.15.6. Toxicidad aguda

Dentro de la línea veterinaria la inyección que se administran rápidamente o en dosis elevadas de cualquier sulfonamida es la que con más frecuencia evidencia toxicidad. Principalmente los signos se observan en bovinos y son: ceguera transitoria, dificultad en el enfoque visual, debilidad y temblores musculares, movimientos de cabeza de un lugar a otro.

Las dosis elevadas en perros estimulan al SNC y los síntomas son: carreras sin finalidad, convulsiones, depresión de los reflejos condicionados, ataxia, anorexia, diarrea, náusea y vómito. (Paredes, 2010, p. 18)

1.3.15.7. Toxicidad crónica

La principal reacción tóxica se presentaba a nivel renal por insuficiencia en la excreción, que acontecía después de varios días de tratamiento. Se presentaba obstrucción renal, que depende de la solubilidad de la sulfonamida, el volumen de orina, cantidad de sulfonamida excretada, pH

de la orina, factores producen cristalización de las sulfonamidas precipitadas, que pinchan y desgarran las células del aparato urinario y pueden llegar a formar cálculos que obstruyen los túbulos colectores, la pelvis renal o los uréteres. Esos efectos se pueden disminuir aumentando el consumo de agua. La corta duración de los tratamientos con las sulfonamidas que se potencian con trimetoprim hace casi imposible la presentación de signos de toxicidad; así como la reducción de los tiempos de espera después del tratamiento para la utilización comercial del huevo. (Paredes, 2010, p. 18)

1.3.16. Sulfametoxazol

El nombre químico es 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) bencensulfonamida-. Su peso molecular de 253.31, y su fórmula química es $C_{10}H_{11}O_3S$

Polvo cristalino de color blanco-amarillento, inodoro, ligeramente soluble en agua, éter y cloroformo, en 50 partes de etanol y en 3 partes de acetona, soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos; moderadamente solubles en alcohol. (Unipharm, 2015)

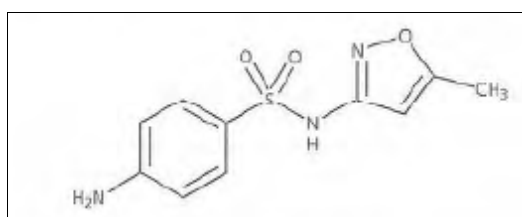


Figura 1-1: Fórmula estructural del Sulfametoxazol

Fuente: BOTANA, 2002. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*.

Sulfonamida de acción corta a intermedia principalmente usadas en el tratamiento de infecciones en pequeños animales, primordialmente las causadas por *E. coli*. Muy solubles que se eliminan por vía renal con una semivida en torno a las 5 horas, lo que da lugar a altas concentraciones en la orina. Por lo tanto, presume un riesgo mínimo de aparición de cristaluria. (BOTANA, 2002, p. 452)

1.3.16.1. Farmacocinética

El Sulfametoxazol se absorbe de 70 a 90% por la vía digestiva, alcanza rápidamente concentraciones terapéuticas en plasma, líquido cefalorraquídeo, sinovial y peritoneal debido a la fijación con las proteínas plasmáticas y su liposolubilidad. Es metabolizado parcialmente a nivel hepático por acetilación y glucuronidación, estos metabolitos no tienen actividad antibacteriana. En una alta proporción son eliminados por la orina como droga libre y otra parte metabolizada. (Genéricos Veterinarios, 2015)

1.3.16.2. Mecanismo de Acción

El sulfametoxazol es un agente bacteriostático perteneciente a la familia de las sulfonamidas, comparte una estructura química similar al ácido paraaminobenzoico (PABA), su acción se realiza mediante el bloqueo de la conversión del PABA en ácido dihidrofólico y con esto detener la síntesis de timina y purina además de competir por la acción de una enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. (Genéricos Veterinarios, 2015)

1.3.16.3. Indicaciones

Está indicado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas que afectan a todos los animales domésticos caninos, felinos, ovinos, aves y conejos. El Sulfametoxazol posee un amplio espectro de acción que incluye bacterias: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Nocardia spp.* También actúa contra muchos microorganismos de la familia de las enterobacterias excepto contra *Pseudomonas aeruginosa* y algunos protozoarios (*Coccidias* y *Toxoplasma*) las cuales son inhibidas por la combinación Trimetoprima – Sulfametoxazol. (Genéricos Veterinarios, 2015)

1.3.16.4. Dosificación.

Vía de Administración Oral, repetir el Tratamiento por 5 días consecutivos. (Farbiovet S.A., 2015)

Tabla 1-1: Cuadro de Dosificación para el Producto Bactrivet.

Caninos	Adultos	5 mL cada 12 horas
	Cachorros	2.5 mL cada 12 horas
Felinos	Adultos	1.5 mL cada 12 horas
	Cachorros	1 mL cada 12 horas
Ovinos	Adultos	15 mL cada 12 horas
Conejos	-----	2 mL cada 12 horas
Aves	-----	1 mL cada 12 horas

Fuente: Farbiovet S.A.

1.3.16.5. Efectos adversos

El efecto adverso más importante que produce el Sulfametoxazol es la queratoconjuntivitis seca en perros, que no es específica de raza y se cree que se debe a un efecto directo del nitrógeno contenido en el anillo piridínico sobre las células lagrimales. Ocasionalmente produce eritema, petequias, hemorragias internas y hematuria. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 150)

1.3.16.6. Tiempo de retiro

El tiempo de retiro para carne es de siete u ocho días, y para huevo, de 10 días. (Sumano & Ocampo, 1997, p. 150)

1.3.17. Cromatografía

El primero en definir cromatografía fue el Ruso Mikhail Tswett en 1906, quien usó el término para describir la separación que observó en una solución con pigmentos de plantas cuando pasaron a través de columnas de carbonato de calcio o alumina, usando éter de petróleo. Cada pigmento se adhirió de manera diferente a medida que la mezcla se filtraba, separándose en forma de capas en la columna. Como el resultado de este análisis fue determinado en base a la separación de pigmentos por sus colores a lo largo de una columna adsorbente Tswett llama a la nueva técnica "cromatografía. A pesar de que no se utilizó sino hasta 1930, específicamente cuando empezó la utilización de la capa fina y el intercambio de iones, es la base para que en la actualidad la cromatografía líquida se fundamente en la utilización de una fase móvil líquida para transportar los componentes de una muestra a través de una columna que contiene en su interior un determinado material sólido que se denomina como fase estacionaria, donde los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente, es decir, son más retenidos, mientras que los más afines a la fase móvil o menos retenidos se mueven con mayor rapidez. (Chromacademy, 2015, p. 3) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 1)

El medio cromatográfico contribuye a la separación de cada una de las sustancias que constituyen una mezcla funcionando como controlador de velocidad y permite la identificación química mediante el uso de un detector.

En base al mecanismo de retención la cromatografía puede ser de adsorción, de partición líquido – líquido, de intercambio iónico, de permeación sobre gel, y de afinidad. (Chromacademy, 2015, p.3) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 1)

1.3.18. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Método físico de separación cuantitativa que se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una móvil y otra estacionaria, la fase móvil es líquida y sirve para el transporte de los analitos en una muestra a través de una columna que contiene un material en fase estacionaria. (Chromacademy, 2015, p.4) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 15)

En el análisis por HPLC no hay problemas de volatilidad de la muestra; sin embargo, el analito debe ser soluble en la fase móvil, las muestras se pueden analizar bajo un amplio rango de polaridad. Los componentes que forman parte de la fase móvil se determinan con el fin de asegurar la solubilidad de la muestra, pero puede impedir el análisis de moléculas muy grandes. El tamaño de las partículas de fase estacionaria se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir. (Chromacademy, 2015, p.5) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 18)

1.3.18.1. Mecanismos de Separación Cromatográfica

La separación mediante HPLC se realiza a través de una fase móvil (líquido) y una fase estacionaria (materiales de diferente hidrofobicidad químicamente unidos a un soporte), el tipo de fase estacionaria establece la fuerza con la que se retiene el analito. (Chromacademy, 2015, p.6)

1.3.18.2. Instrumentación

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- a) Depósitos para la fase móvil: los recipientes donde se almacenan la fase móvil deben ser inertes, generalmente son de vidrio.
- b) Desgasificador: se utilizan para eliminar el aire de las líneas que conducen la fase móvil.
- c) Sistema de bombeo: la bomba permite introducir la fase móvil a través de la columna, debido a las elevadas presiones y el pequeño tamaño de partículas de la fase estacionaria. Se emplean tres tipos de bombas en HPLC, las bombas recíprocas o de vaivén, bombas neumáticas o de presión constante, bombas de desplazamiento o tipo jeringa.
- d) Sistema de inyección de muestras: se debe inyectar volúmenes pequeños para evitar que la columna se sobrecargue. Hay varios tipos; la más simple es la de una jeringa de alta presión con un diafragma a la entrada de la columna, las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, que es el más utilizado.
- e) Columna cromatográfica: aquí se permite la separación mediante la velocidad diferencial de los solutos. La eficacia de la columna aumenta al disminuir el tamaño de partículas de la fase estacionaria. En ciertos casos se controla la temperatura de la columna porque las separaciones son más reproducibles cuando la temperatura es constante.
- f) Detector: proporciona información cualitativa y cuantitativa de los componentes de la muestra. Debe tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, no varía ante cambios de temperatura y humedad. El detector más utilizado es el de absorbancia ultravioleta, que se fundamenta en la

espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta a una determinada longitud de onda.

- g) Sistema para el tratamiento de datos y registrador. (Chromacademy, 2015, p.6) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 22)

La Fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla, que tienen que ser grado HPLC, es decir con una pureza del 99% o más, que no contenga contaminantes que interfieran en la elución de la muestra o a su vez partículas que taponen la columna, por lo cual es importante filtrar estos disolventes antes de que ingresen al sistema. En dependencia al equipo se puede o no programarlo para que tome determinadas cantidades de disolvente y las mezcle, cuando se usa el mismo disolvente durante toda la separación se trata de un proceso isocrático.

La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora que permite introducir la muestra; luego se produce la separación en la columna, las dimensiones de la columna y la naturaleza química de la fase estacionaria pueden ser elegidos y optimizados para dar separaciones de la calidad requerida, cuanto más larga sea la columna, existe mayor interacción con la fase estacionaria por ende mayor separación; los componentes de la muestra pasan al detector el que da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de cada componente, las condiciones del detector se pueden elegir para dar una mejor respuesta a los analitos de interés y lograr una buena sensibilidad, cromatógrafos con detectores ultravioleta (UV) son relativamente sensibles, operan a temperatura ambiente, también tiene la capacidad de producir señales asociadas con componentes de la muestra y al no ser destructivos el analito puede ser recuperado; la señal producida por el detector pasa a un registrador que emite un cromatograma de la intensidad en función del tiempo, lo ideal es que se obtengan picos gaussianos que debe corresponder a cada componente de la muestra; finalmente el integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede comparar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón. (Chromacademy, 2015, p.7) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 23)

Con el fin de obtener una buena separación se debe optimizar varios parámetros del instrumento y de la columna del HPLC, lo que nos ayuda a generar un adecuado cromatograma que cumpla con los propósitos cualitativos y cuantitativos para lo que fue establecido, y se han determinado los siguientes elementos que deben ser optimizados:

- Composición de la fase móvil y naturaleza química de fase estacionaria
- Dimensión de columna
- Volumen de inyección
- Muestra de pre-tratamiento y concentración
- Caudal Fase móvil

- Temperatura de la columna
- Parámetros del detector (Chromacademy, 2015, p.8)

1.3.18.3. El Cromatograma

Los componentes que eluyen de la columna se pasan a un detector, donde se produce una respuesta en base a las propiedades físico-químicas del analito, dicha respuesta se amplifica y se representa gráficamente en relación al tiempo generándose un cromatograma. (Chromacademy, 2015, p.10)

Los componentes que no se conservan dentro de la columna eluyen en el tiempo muerto (t_0). Los compuestos que se retienen, eluyen en forma de picos, que son los cromatogramas. Los tiempos de retención proporcionan el aspecto cualitativo del cromatograma que para un compuesto debe tener las mismas condiciones cromatográficas. La altura del pico cromatográfico se relaciona con la cantidad de analito. Para la determinación de la cantidad real del compuesto, el área o altura se compara con los estándares de concentración conocida. (Chromacademy, 2015, p.10)

1.3.18.4. Volumen y tiempo de retención

El volumen y tiempo de retención (V_r) (T_r) es el volumen de fase móvil o tiempo necesario para transportar la banda de soluto a través de la columna desde el punto de inyección hasta el detector en el punto máximo del pico del soluto. El volumen muerto (V_0) es el espacio muerto o volumen de retraso de la columna. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 30)

1.3.18.5. Factor de capacidad (k)

También se lo conoce como factor de retención, describe las velocidades de migración de los solutos en columnas. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 30)

1.3.18.6. Selectividad (α)

El factor de selectividad para una columna es la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 30)

1.3.18.7. Eficiencia

La eficiencia de la columna depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando una sustancia pasa a través de la columna. Para medir cuantitativamente se relaciona la altura del plato y la cantidad de platos o número de platos teóricos. La eficiencia de la columna aumenta mientras mayor sea el número de platos teóricos y la altura sea menor. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 31)

1.3.18.8. Resolución Cromatográfica

Medida cuantitativa de la capacidad de separar dos analitos, la resolución puede mejorar para una fase estacionaria alargando la columna, lo que incrementa el número de platos, que no resulta conveniente porque aumentaría el tiempo necesario para la separación. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 31)

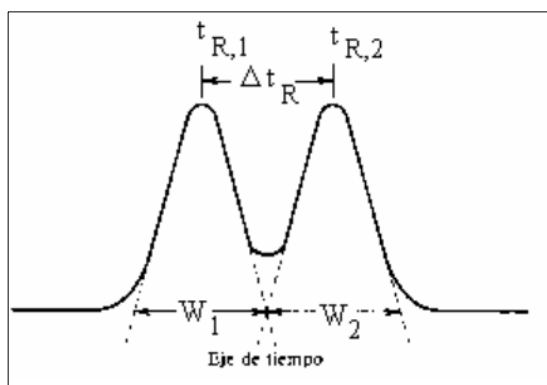


Figura 2-1. Definición de la Resolución

Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México. 2007. *Técnicas Cromatográficas*.

1.3.18.9. Número de Platos Teóricos

Expresa el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases en el paso por la columna, es una medida adimensional. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 32)

1.3.18.10. Asimetría (AF)

El factor de asimetría del pico es la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. La asimetría del pico es mayor mientras más abajo se mida, debido al ruido del detector, es aceptable medir el pico a una altura del 10%. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, p. 32)

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de la Investigación

LUGAR: La presente investigación se llevó a cabo en la Industria Farmacéutica Veterinaria FARBIOVET S.A.

PROVINCIA: Pichincha

CANTÓN: Quito

DIRECCIÓN: Alangasí. Calle Guayas N°E3-296 y Av. Pichincha Sector Lomas de La Concepción, vía a Pintag.

2.2. Protocolo de Validación del Método Analítico para Valorar Sulfametoxazol

2.2.1. Generalidades

Esta documentación describe el método analítico, responsabilidades y criterios de aceptación de la Validación del Método Analítico para la cuantificación de Sulfametoxazol por Cromatografía Líquida de alta eficiencia HPLC, en Bactrivet como suspensión oral por 60 mL.

2.2.2. Objetivo

Demostrar que el Método Analítico utilizado para valoración de Sulfametoxazol en suspensión oral, cumple con los requerimientos para el que fue diseñado así como con los criterios de aceptación establecidos.

2.2.3. Alcance / Aplicación

Método cromatográfico para cuantificar Sulfametoxazol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en Bactrivet suspensión oral.

2.2.4. Responsabilidades

Gerente general

Será responsable de proveer los recursos suficientes y necesarios para realizar la validación.

Jefe de Aseguramiento de calidad

Aprobar la documentación presentada por el comité de validación (programa de validación y su avance).

Planificar, coordinar y facilitar la validación.

Revisar el programa de validación, revalidación y su avance.

Comité de validación

Definir los criterios de aceptación.

Definir el personal que debe participar directa o indirectamente en la validación.

Tomar las decisiones y acciones requeridas para garantizar la certificación y control del proceso.

Revisión de la documentación de validación.

Jefe de Validaciones / Analista de Validaciones

Responsables de ejecutar las validaciones.

2.2.5. Método de Análisis

El método analítico para valorar Sulfametoxazol, en Bactrivet suspensión oral no se encuentra compendiado, por tanto el método a validar se basa en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) usando como disolvente metanol y como fase móvil Acetonitrilo: Metanol, las lecturas se realizan a una longitud de onda de 254 nm, propuesto en las especificaciones y métodos de análisis de producto.

2.2.6. Fundamento

Bactrivet como suspensión oral es extraído con el disolvente (metanol), con ayuda del ultrasonido por 10 minutos, se afora a 25 mL y se toma una alícuota de 1 mL en un balón de 10 mL y se mezcla.

Las muestras se cuantifican por HPLC, a una longitud de onda de 254 nm.

2.2.7. Materiales, Equipos y Reactivos

Para el estudio se obtienen muestras de retención del medicamento “Bactrivet” que contiene Sulfametoxazol como suspensión oral; se usa como muestras tres lotes diferentes de estos productos elaborados por Farbiovet S.A (F08725-1, F09118-1, F09161-1).

Materiales de Laboratorio:

- Balones volumétricos (10 y 25 ml).
- Filtros de jeringa (0.45 μ m) de celulosa.
- Filtros de membrana, 0.22 μ m de poro, 47 mm de diámetro, hidrofílica de nylon.
- Jeringuillas plásticas (5 mL).
- Pipeta (10 mL).
- Vasos de precipitación (25 ml).
- Viales para automuestreador (2 mL).
- Columna: NUCLEOSIL C18 5 μ m 250 mm x 4.6 mm
- Dispensador de agua
- Guantes quirúrgicos
- Papel toalla

Equipos:

- Cromatógrafo # 2 Marca Perkin Elmer Modelo 785A. Ubicado en el Laboratorio de Control de Calidad FARBIOVET S.A.
- Sistema de extracción al vacío compuesto de kitasato de 1000 mL, reservorios de 250 mL con membrana de filtro poroso y pinza metálica
- Bomba de vacío
- Balanza analítica de precisión 0.01 mg Mettler Toledo, modelo AG 245
- Baño sonicador / desgasificador Branson.
- Equipo Purificador de agua Millipore.

Reactivos:

- Acetonitrilo grado HPLC.

- Agua grado analítico Tipo II.
- Metanol grado HPLC.

Estándares:

- Patrón de pureza conocida de Sulfametoxazol

2.2.8. Condiciones Cromatográficas

Columna: NUCLEOSIL C18

- Tamaño del poro: 5 µm
- Diámetro: 250 mm x 4.6 mm
- Frita: 2 µm

Fase móvil:

- Acetonitrilo: 66.5% (v/v)
- Metanol : 33.5% (v/v)

Detector UV/VIS

- Longitud de onda: 254 nm.

Temperatura de columna: 25 °C.

Volumen de Inyección: 20 µL.

Flujo: 1.0 mL/ min.

Tabla 1-2. Procedimiento para la Preparación de la Fase Móvil

Nº	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Filtrar el metanol grado HPLC una vez en el equipo de filtración al vacío usando un filtro de membrana hidrofílica de 0.22 µm de poro.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
2	Filtrar el Acetonitrilo grado HPLC una vez de la misma forma como se indica anteriormente.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
3	Desgasificar colocando cada componente de la fase móvil en el equipo de ultrasonido por 10 minutos.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
4	Ubicar los solventes en la bandeja sobre cromatógrafo líquido, en las vías deseadas programar la bomba de la siguiente manera: Metanol 33.5%. (v/v) Acetonitrilo 66.5%. (v/v)	AVAL/ACC/AxCC	N/A

Fuente: FARBIOVET S.A. Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet.

Tabla 2-2. Procedimiento para la Preparación del Estándar

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Pesar 25 mg del patrón químico de Sulfametoxazol (tomar en cuenta la pureza).	AVAL/ACC/AxCC	Certificado del patrón químico primario o secundario
2	Transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 25 mL.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
3	Añadir 10 mL de metanol grado HPLC. Ultra sonar durante 5 minutos en el sonicador / desgasificador.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
4	Aforar con Metanol grado HPLC.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
5	Tomar una alícuota de 1 mL llevar a un balón volumétrico de 10 mL Aforar con metanol grado HPLC. Concentración del estándar 0.1 mg/mL.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
6	Filtrar el estándar por un filtro de 0.45 µm y colocar en un vial	AVAL/ACC/AxCC	N/A
7	Injectar	AVAL/ACC/AxCC	N/A

Fuente: FARBIOVET S.A. Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet.

Tabla3-2. Procedimiento para la Preparación de la Muestra

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Pesar el equivalente a 25 mg de la muestra Bactrivet, llevar a un balón volumétrico de 25 ml.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
2	Disolver con 10 ml de Metanol grado HPLC.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
3	Ultra sonar la muestra durante 5 minutos en el sonicador / desgasificador	AVAL/ACC/AxCC	N/A
4	Aforar con Metanol grado HPLC.	AVAL/ACC/AxCC	N/A
5	Tomar una alícuota de 1 mL llevar a un balón volumétrico de 10 mL	AVAL/ACC/AxCC	N/A
6	Aforar con metanol	AVAL/ACC/AxCC	N/A
7	Filtrar la solución por un filtro de 0.45 µm y colocar en un vial	AVAL/ACC/AxCC	N/A
8	Injectar 3 repeticiones de la muestra. Concentración de la muestra: 0.1 mg/ML	AVAL/ACC/AxCC	N/A

Fuente: FARBIOVET S.A. Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet.

2.3. Proceso de Validación del Método

2.3.1. Criterios de Aceptación de los Parámetros de Validación

Tabla 4-2. Criterios de Aceptación de los Parámetros de Validación

ENSAYOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Selectividad	% de Discrepancia, en caso de existir interferencias < 3%
Linealidad	$r \geq 0.995$
Precisión del Sistema	RSD ó CV ≤ 2 %
Precisión del Método	RSD ó CV ≤ 2 %
Repetibilidad	RSD ó CV ≤ 2 %
Precisión Intermedia	RSD ó CV ≤ 2 %
Exactitud	% de Recuperación 98% - 102%
Límite de detección	Determinación de la mínima concentración detectable.
Límite de Cuantificación	Determinación de la mínima concentración cuantificable.
Robustez	Método óptimo, interacción de mayor influencia.
Incertidumbre	< 40%

Fuente: FARBIOVET S.A. Plan Anual de Validaciones.

2.3.2. Parámetros de Validación

- Selectividad
- Linealidad
- Rango
- Precisión del sistema
- Precisión del método
- Exactitud
- Límite de Detección y Límite de Cuantificación
- Robustez
- Incertidumbre

2.3.2.1. Selectividad

Esta prueba demostrará que el método es capaz de diferenciar el analito y las posibles interferencias que pueden presentarse en la muestra.

Tabla 5-2. Requerimientos de muestras para análisis de Selectividad

Analito Problema	Muestra del producto a validar
Blanco de Matriz	Todo lo que acompañe en la formulación excepto el analito de interés (Placebo).
Blanco de Matriz + Analito acompañante.	Blancos de matriz que contienen otros analitos presentes en la formulación.
Diluyente	Diluyente usado para la preparación de muestras (metanol).

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 6-2. Procedimiento para la determinación de la Selectividad

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 1 Blanco de Matriz siguiendo el Protocolo de Fabricación del producto Bactrivet.	JVAL/ AVAL	Protocolo de Fabricación Bactrivet N° 8725
2	Preparar 3 muestras del blanco de matriz. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
3	Injectar por triplicado cada muestra.	JVAL/ AVAL	N/A
4	Preparar 3 muestras del producto Bactrivet. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
5	Injectar por triplicado cada muestra.	JVAL/ AVAL	N/A
6	Preparar 3 muestras del blanco con trimetoprim. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
7	Injectar por triplicado cada muestra.	JVAL/ AVAL	N/A
8	Injectar por triplicado una muestra del disolvente (metanol grado HPLC).	JVAL/ AVAL	N/A
9	En el caso de que se observen interferencias se calcula su nivel a partir del análisis de 6 repeticiones de la muestra en presencia y ausencia de posibles interferencias, y calcular el límite máximo del porcentaje de discrepancia.	JVAL/ AVAL	HC-S-043
10	En el caso de que existan picos cromatográficos se realiza el cálculo de la Resolución Cromatográfica para confirmar que no exista interpolación entre los picos.	JVAL/ AVAL	N/A

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Análisis de datos

% Discrepancia: En caso de existir interferencia se evaluará su límite máximo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Discrepancia} = \frac{D_i - D_s}{D_s} * 100$$

D_i = Respuesta media con interferencia

D_s = Respuesta media sin interferencia

Resolución Cromatográfica:

$$R_s = \frac{(t_R 2 - t_R 1)}{0.5 (W_1 + W_2)}$$

t_R = tiempo de retención de los picos cromatográficos

W = ancho del pico cromatográfico en la línea base (20)

2.3.2.2. Linealidad

Se evaluará la concentración del analito vs la Respuesta del equipo que deberá ser directamente proporcional en un rango establecido.

Tabla 7-2. Procedimiento para Análisis de Linealidad

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 5 muestras de estándar de Sulfametoxazol a diferentes concentraciones así: 80% 0.08 mg/ mL 90% 0.09 mg/ mL 100% 0.1 mg/ mL 110% 0.11 mg/ mL 120% 0.12 mg/ mL Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Injectar la muestra de cada concentración.	JVAL/ AVAL	N/A
3	El ensayo se realizará durante 5 días.	JVAL/ AVAL	N/A
4	Se realiza la ecuación de la recta, el test de Cochran, el test de la verificación de la pendiente y el test de verificación de la variable independiente en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Li-043
5	Se realiza la curva de calibración y el cálculo de la Regresión Lineal en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Lirl-043
6	Se realiza el Análisis de Varianza de un Factor en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Lia-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 8-2. Esquema para la obtención de datos para la Linealidad

Concentración del analito (mg/mL).	Respuesta del equipo				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0.08					
0.09					
0.1					
0.11					
0.12					

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

La evaluación para la linealidad se realizará mediante la representación gráfica y determinación estadística de:

- Curva de Calibración
- Ecuación de la recta
- Test de Cochran
- Test de Verificación de la Pendiente o Linealidad
- Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad
- Regresión Lineal
- Análisis de Varianza de un Factor ANOVA

Para lo cual se utilizará las siguientes ecuaciones:

Ecuación de la recta: $y = b \cdot x + a$

Término independiente (a)

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Pendiente (b)

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Coficiente de Correlación (r)

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

Coficiente de Determinación (r²)

$$r^2 = \frac{SC_{REG}}{SC_T}$$

Cálculo de la Desviación Estándar Residual (S_{y.x})

$$S_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 2}}$$

Cálculo de la Desviación Estándar de la pendiente (S_b)

$$S_b = \frac{S_{y.x}}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}}$$

Cálculo de la Desviación Estándar del término independiente (S_a)

$$S_a = S_{y.x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x - \bar{x})^2}}$$

Test de Homogeneidad Test de Cochran

G experimental

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{\sum s_i^2} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

Test de Verificación de la Pendiente o Linealidad

Coeficientes de variación de los factores de respuesta (f)

$$f = \frac{y_i}{x_i} \quad CV = \frac{s_t}{\bar{f}} * 100$$

Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Prueba t de Student

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b} \quad t_{exp} = \frac{|a|}{s_a}$$

I		Grupos
J	=	Series
\bar{x}	=	Media de x
\bar{y}	=	Media de y
SC _{REG}	=	Suma de cuadrados debido a la regresión
SC _T	=	Suma de cuadrados total
S _i ²	=	Varianza de cada grupo
S ² _{máxima}	=	Varianza máxima de los grupos
\bar{f}	=	Valor medio de los factores de respuesta
S _F	=	Desviación estándar de los factores de respuesta
S _b y S _a	=	Se obtiene a partir de los cálculos de la varianza residual S _{y.x}

Tabla 9-2. Análisis Simple de varianza ANOVA para la Linealidad

Análisis Simple de Varianza			
Origen de la Varianza	Grados de libertad (v)	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias
Entre niveles	$v_1 = k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p (\bar{x} - x)^2$	$DMC_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro de niveles	$v_2 = n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^k 1 \sum_{j=1}^p p (\bar{x}_{ij} - x_i)^2$	$DMC_W = \frac{SDC_W}{k - 1}$
Total	$v = n - 1$ $= (v_1 - v_2)$	$SDC_T = \sum_{i=1}^k 1 \sum_{j=1}^p p (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DMC_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

Fuente: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 2001

Las diferencias cuadráticas medias (DCM) son las respectivas varianzas.

Se evaluará el valor estimado de F el mismo que será comparado con el correspondiente valor se F tabulado:

$$\hat{F} = \frac{DCM_B}{DCM_W}$$

La desviación estándar de Repetibilidad (S_r) se calcula con la siguiente ecuación:

$$S_r = \sqrt{DCM_W}$$

Utilizando la S_r se calculará la desviación estándar relativa de la Repetibilidad RSDr.

$$SD_r = \left(\frac{S_r}{\bar{x}} \right) * 100$$

2.3.2.3. Precisión del Sistema

Tabla 10-2. Procedimiento para el Análisis de Precisión del Sistema

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 4 soluciones del estándar de Sulfametoxazol siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Injectar 3 repeticiones del estándar por cada día.	JVAL/ AVAL	N/A
3	La determinación se realizará durante 5 días.	JVAL/ AVAL	N/A
4	El análisis estadístico se realizara en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-PS-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 22. Esquema para la obtención de datos de la Precisión del Sistema

Estándar	Repeticiones	Respuestas				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
E ₁	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					
E ₂	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					
E ₃	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					
E ₄	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

La estimación de la precisión del sistema se realizará con el cálculo del coeficiente de variación o Desviación Estándar Relativa

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

S = desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

2.3.2.4. Precisión del Método

Tabla 12-2. Procedimiento para el Análisis de la Precisión del Método

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 1 solución de la muestra Bactrivet de tres lotes distintos. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Inyectar 2 repeticiones de cada muestra por día.	JVAL/ AVAL	N/A
3	La determinación se realizará durante 5 días.	JVAL/ AVAL	N/A
4	El análisis estadístico se realizara en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-PM-043
5	Calcular los intervalos de confianza para cada una de las muestras.	JVAL/ AVAL	HC-PM-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 13-2. Esquema para la obtención de datos de la Precisión del Método

Lote	Repeticiones	Respuestas				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
L ₁	R ₁					
	R ₂					
L ₂	R ₁					
	R ₂					
L ₃	R ₁					
	R ₂					

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

La estimación de la precisión del método se realizará con el cálculo del coeficiente de variación o Desviación Estándar Relativa

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

s = desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

Intervalos de confianza

Por cada nivel de concentración estudiado.

$$\text{Resultados individuales} \quad \bar{x} \pm t * s$$

$$\text{Resultados Promedios} \quad \bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} = media de una serie de resultados obtenido en un mismo nivel de concentración

t = Valor de la t de Student de tablas para $n-2$ grados de libertad y $\alpha = 0.05$

n = número de análisis

s = Desviación estándar

2.3.2.5. Repetibilidad

Este ensayo deberá ser realizado por el mismo analista, en el mismo equipo, en las mismas condiciones.

Tabla14-2. Procedimiento para el Análisis de Repetibilidad

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 1 muestra de Bactrivet al 100% de tres lotes diferentes. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Injectar 2 repeticiones de cada muestra por día.	JVAL/ AVAL	N/A
3	La determinación se realizará durante 1 día.	JVAL/ AVAL	N/A
4	El análisis estadístico se realizara en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Re-043
5	Calcular los intervalos de confianza para cada una de las muestras.	JVAL/ AVAL	HC-Re-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 15-2. Esquema para la obtención de datos de la Repetibilidad

MUESTRA	Repeticiones	Respuestas Área
L ₁	R ₁	
	R ₂	
L ₂	R ₁	
	R ₂	
L ₃	R ₁	
	R ₂	

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

La estimación de la repetibilidad del método se realizará con el cálculo del coeficiente de variación o Desviación Estándar Relativa de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza al nivel de concentración estudiado.

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

s = desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

Intervalos de confianza

Por cada nivel de concentración estudiado.

Resultados individuales $\bar{x} \pm t * s$

Resultados Promedios $\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$

\bar{x} = media de una serie de resultados obtenido en un mismo nivel de concentración

t = Valor de la t de Student de tablas para n-2 grados de libertad y $\alpha = 0.05$

n = número de análisis

s = Desviación estándar

2.3.2.6. Precisión Intermedia

Determinar la variabilidad del método sobre una misma muestra en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

Tabla 16-2. Procedimiento para el Análisis de la Precisión Intermedia

Nº	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 1 solución de Bactrivet a una concentración del 100% de tres lotes distintos. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Injectar 2 repeticiones de cada muestra por día.	JVAL/ AVAL	N/A
3	La determinación se realizará durante 5 días.	JVAL/ AVAL	N/A
4	Con 2 diferentes analistas (cada analista prepara las muestras para el análisis).	JVAL/ AVAL	N/A
5	El análisis estadístico se realizará en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-PI-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 17-2. Esquema para la obtención de datos de la Precisión Intermedia

Lote	Analistas	Repeticiones	Respuestas				
			Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
L ₁	Analista 1	R ₁					
		R ₂					
	Analista 2	R ₁					
		R ₂					
L ₂	Analista 1	R ₁					
		R ₂					
	Analista 2	R ₁					
		R ₂					
L ₃	Analista 1	R ₁					
		R ₂					
	Analista 2	R ₁					
		R ₂					

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

La estimación de la precisión intermedia se realizará con el cálculo del coeficiente de variación o Desviación Estándar Relativa

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

s = desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

2.3.2.7. Exactitud

Tabla 3. Procedimiento para el Análisis de Exactitud

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 3 soluciones de estándar de Sulfametoxazol diferentes concentraciones así: 90% 0.09 mg/mL 100% 0.1 mg/mL 110% 0.11 mg/mL Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Injectar 3 repeticiones de cada solución de estándar por día. La determinación se realizará durante 5 días.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet.
3	El análisis estadístico se realizara en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Ex-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Se calcula el porcentaje de la recuperación de 9 determinaciones a 3 niveles de concentración del estándar expuestos en la tabla 20.

Tabla 19-2. Esquema para la obtención de datos de la Exactitud

Concentración del estándar	Repeticiones	Respuestas				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
C1	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					
C2	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					
C3	R ₁					
	R ₂					
	R ₃					

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Mediante la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{x_m}{\mu} * 100$$

%R = Porcentaje de Recuperación

X_m = valor medio hallado

μ = Valor aceptado como verdadero

2.3.2.8. Límite de Detección (LD)

Concentración de analito con una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

$$LD = Y_B + 3S_B$$

$$Y_B = a$$

$$S_B = S_{y/x}$$

2.3.2.9. Límite de Cuantificación (LC)

Concentración de analito con una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco.

$$LC = Y_B + 10S_B$$

$$Y_B = a$$

$$S_B = S_{y/x}$$

2.3.2.10. Robustez

Tabla 20-2. Factores de Variación para el Análisis de Robustez

(A)	Temperatura de la columna a $25^{\circ}\text{C} \pm 8^{\circ}\text{C}$
(B)	Volumen de Inyección: $20\text{ul} \pm 5\text{ ul}$
(C)	Flujo: $1\text{ ml / min} \pm 0.1$

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 21-2. Procedimiento para el Análisis de Robustez

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Preparar 4 muestras de Bactrivet a concentración de 100%. Siguiendo las instrucciones del “Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet”.	JVAL/ AVAL	Procedimiento para Análisis de Sulfametoxazol en Bactrivet. POE-CCPt-043
2	Inyectar 2 repeticiones de cada muestra. De acuerdo a cada factor de variación.	JVAL/ AVAL	N/A
3	El análisis estadístico se realizara en una hoja de cálculo Excel.	JVAL/ AVAL	HC-Ro-043

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Tabla 22-2. Esquema de la Matriz Factorial para el diseño de la Robustez

N° Ensayo	FACTORES			INTERACCIONES			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Se realizará un diseño factorial completo de ocho experimentos (2^3) para evaluar la influencia de tres factores A, B, C así como las interacciones dos a dos. Y de los tres conjuntamente.

De donde, se obtendrán los ocho resultados para determinar el contenido en principio activo.

Calcular el intervalo de confianza de cada factor de variación A, B, C

$$A \pm t * \frac{S_{exp}}{\sqrt{n}}$$

t = coeficiente de student para probabilidad $(1-\alpha/2)$ y el número de grados de libertad de S_{exp}

S_{exp} = desviación estándar de los resultados de los experimentos

n = Número de experimentos.

2.3.2.11. Incertidumbre

Tabla 23-2. Procedimiento para el Análisis de la Incertidumbre

N°	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	DOCUMENTOS ASOCIADOS
1	Determinar de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes.	JVAL/ AVAL	Diagrama de Espina de Pescado de las Fuentes de Incertidumbre. HC-I-043
2	Realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método. Expresar los componentes en una incertidumbre estándar.	JVAL/ AVAL	N/A
3	Cálculo de la Incertidumbre tipo A: Preparar 1 muestra de Bactrivet a concentración de 100%.	JVAL/ AVAL	Cálculo de la Precisión Intermedia. HC-PI-043

	Inyectar 2 repeticiones de cada solución de muestra por día. La determinación se realizará durante 5 días, por dos analistas. Calcular la Incertidumbre.		
4	Cálculo de la Incertidumbre tipo B: Establecer por separado la información por medios documentados tanto del proceso de pesaje así como del proceso de dilución a que fue sometida la muestra. Calcular la incertidumbre de cada proceso. Combinar estas incertidumbres.	JVAL/ AVAL	Certificados de Calibración otorgados por un laboratorio acreditado.
5	Calcular la incertidumbre combinada, mediante la suma de las incertidumbres parciales, A y B, de las incertidumbres tipo B tomar la más significativa. La mayor incertidumbre es la representación final de la incertidumbre combinada para la metodología analítica por HPLC.	JVAL/ AVAL	N/A
6	Determinar la incertidumbre expandida.	JVAL/ AVAL	N/A

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Cálculo de la Incertidumbre tipo A

Tabla 24-2. Esquema para la obtención de datos de la Incertidumbre tipo A

Lote	Analistas	Repeticiones	Respuestas					RSD
			Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	
L ₁	Analista 1	R ₁						
		R ₂						
	Analista 2	R ₁						
		R ₂						

Fuente: FARBIOVET S.A. Protocolo de Validación del Método Analítico de Sulfametoxazol.

Calcular la Incertidumbre:

$$u = \frac{RSD \text{ promedio}}{\sqrt{n}}$$

u: Incertidumbre estándar

RSD: Desviación Estándar Relativa

n: Número de muestras analizadas

Cálculo de la incertidumbre tipo B

- **Cálculo de incertidumbre Pesaje**

Calibración de la balanza u_{bal}

$$u_{bal} = \frac{I_{cal}}{K}$$

Repetibilidad de la pesada $u_{Rep.}$

$$u_{Rep} = \frac{Desv.Est}{\sqrt{n}}$$

Especificación de las masas u_{masas}

$$u_{masas} = \frac{I_{cal}}{K}$$

Ical: Incertidumbre de la Calibración establecida por el organismo acreditado (Elicrom)

K: factor de seguridad o de cobertura. K=2 para un nivel de confianza del 95.45%.

Según el CENAM.

n: Número de muestras analizadas

Entonces:

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{masas})^2 + (u_{rep})^2}$$

mstd: masa estándar

Incertidumbre en la pesada de 5 g.

$$\text{Desarrollando: } \left(\frac{u(mstd)}{Mstd} \right)^2$$

- **Cálculo de incertidumbre Diluciones**

Incertidumbre asociada a la concentración del estándar

Balón de (25 ± 0.04) mL (incertidumbre estándar)

Balón de (10 ± 0.025) mL (incertidumbre estándar)

Pipeta (1 ± 0.008) mL (incertidumbre estándar)

$$Cstd = \frac{Pstd}{Vinicial}$$

Cstd: Concentración del Estándar

Pstd: Peso del Estándar

Vinicial: Volumen Inicial

Incertidumbre de C (std)

$$Cstd \pm \sqrt{\left(\frac{I_{MR}}{Pstd}\right)^2 + \left(\frac{I_{std} b_i}{Pstd}\right)^2}$$

$$Cdil = \frac{Cstd \times Vstd}{Vfinal}$$

I_{MR}: Incertidumbre Material de Referencia

Pstd: Peso del Estándar

I_{std} b_i: Incertidumbre estándar del balón inicial

Cdil: Concentración de la dilución

Vstd: Volumen Estándar

Vfinal: Volumen Final

Incertidumbre del Estándar / patrón de pureza conocida

$$\left(\frac{u(Cstd)}{Cstd}\right)^2$$

Incertidumbre de la Alícuota

$$\left(\frac{u(Vstd)}{Vstd}\right)^2$$

Incertidumbre del Balón

$$\left(\frac{u(Vfinal)}{Vfinal}\right)^2$$

Sustituyendo las Incertidumbres parciales en la ecuación general de la Incertidumbre por dilución tenemos:

$$u(c) = C(dil) \times \sqrt{\left(\frac{u(Cstd)}{Cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(Vstd)}{Vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(Vfin)}{Vfin}\right)^2}$$

Tabla 25-2. Resumen de los resultados obtenidos en el cálculo de los diferentes tipos de Incertidumbres

Incertidumbre tipo B	
U _{peso}	
U _{diluciones}	
Incertidumbre tipo A	
U _{reproducibilidad}	

Fuente: SCHMID, W. & LAZOS, R. *Guía para estimar la Incertidumbre de la Medición*. 2000.

Cálculo de la incertidumbre Combinada

Ahora la incertidumbre combinada final es la siguiente:

$$u_c = \sqrt{(u_{tipo A})^2 + (u_{tipo B})^2}$$

Cálculo de la incertidumbre Expandida

Teniendo el resultado de la incertidumbre combinada estándar podemos calcular la incertidumbre expandida (U) del método analítico.

$$U = K \times u_c$$

K= factor de seguridad o de cobertura. Aprox. K=2 para un nivel de confianza del 95.45%

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

3.1.1. *Validación del Método Analítico para determinar Sulfametoxazol en Suspensión oral mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.*

El método analítico para determinar Sulfametoxazol en suspensión oral es un método interno desarrollado por FARBIOVET S.A., se cuantifica el activo utilizando una columna: NUCLEOSIL C18 5um 250mm x 4.6mm y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se trabaja con un estándar de Sulfametoxazol Sigma Aldrich® con una pureza de 99.5%.

Las condiciones cromatográficas con las que se cuantifica el activo son las siguientes:

Fase móvil:

- Acetonitrilo: 66.5% (v/v)
- Metanol : 33.5% (v/v)

Detector UV/VIS

- Longitud de onda: 254 nm.

Temperatura de columna: 25°C.

Volumen de Inyección: 20 ul.

Flujo: 1.0 mL/ min.

3.1.1.1. *Selectividad*

Para la determinación de interferencias en el análisis se compara el pico obtenido de la muestra de “Bactrivet” a una concentración del 100% con el blanco matriz (placebo), con el blanco matriz adicionado otros analitos que acompaña al analito de interés en la formulación en este caso el Trimetoprim y con el diluyente que fue el metanol con el que se preparan todas las disoluciones de las muestras para el análisis.

En caso de existir interferencia se evaluará su límite máximo mediante el cálculo del Porcentaje de Discrepancia.

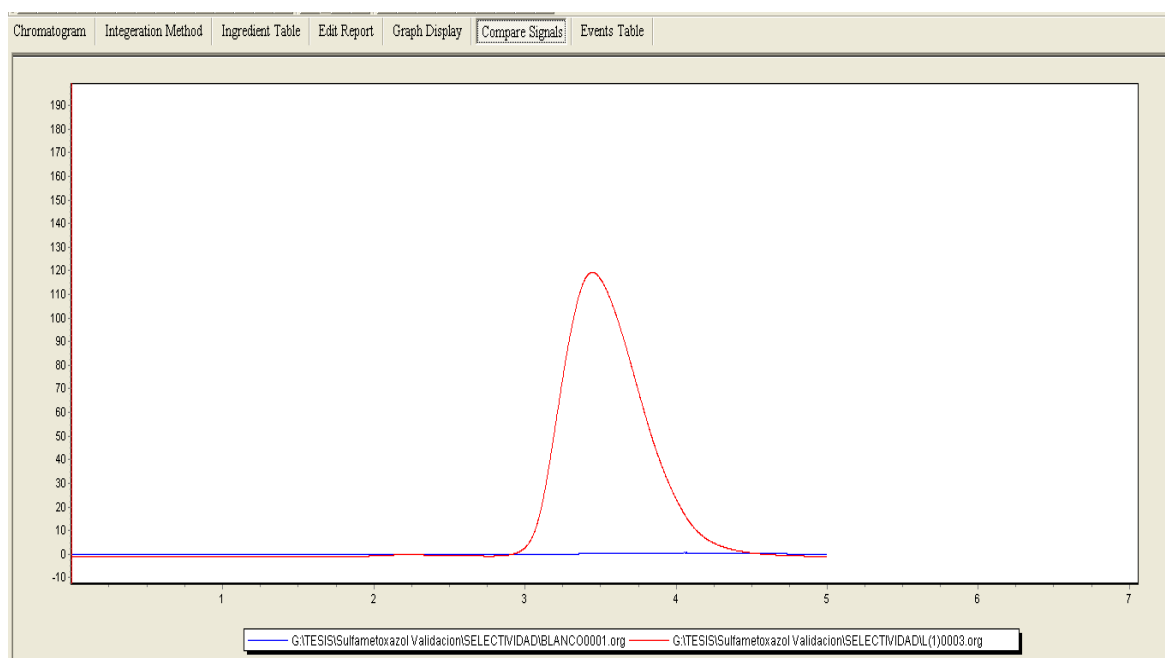


Figura 1-3. Comparación del cromatograma de la muestra y el cromatograma del blanco de matriz.

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Figura 1-3 se evidencia que el cromatograma del blanco matriz que se encuentra de color azul no presenta picos que interfieran o coincidan con el pico cromatográfico de sulfametoxazol presente en la muestra de “Bactrivel” que se encuentra de color rojo. Por lo tanto no fue necesario realizar el cálculo de la discrepancia.

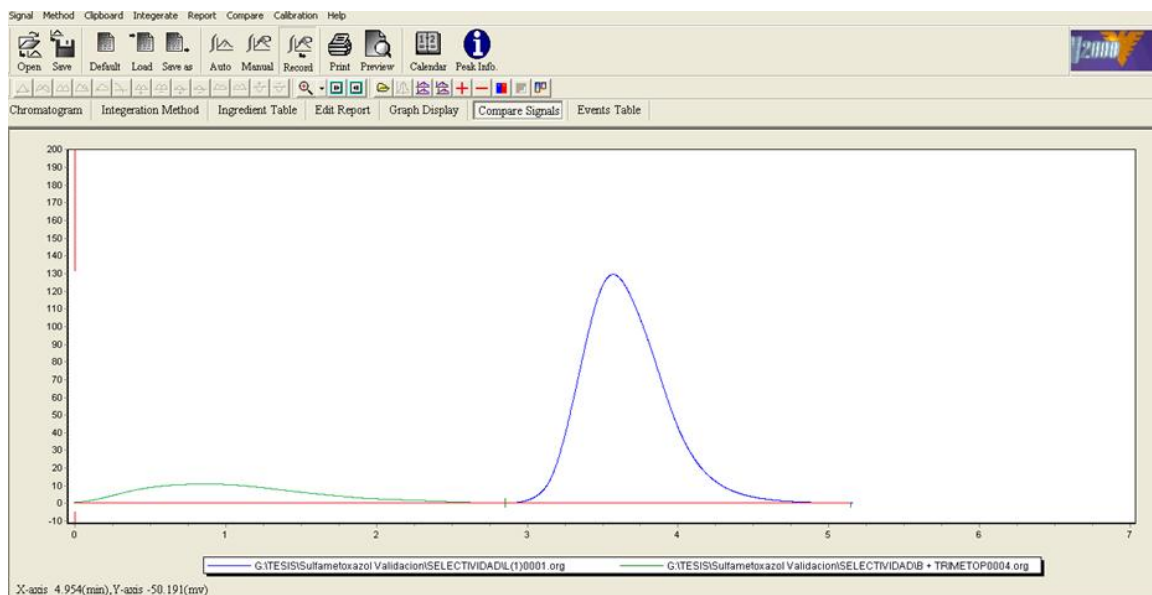


Figura 2-3. Comparación del cromatograma de la muestra y cromatograma del blanco de matriz adicionado el activo acompañante en la formulación.

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Figura 2-3 se evidencia que el cromatograma del blanco de matriz adicionado Trimetoprim que se presenta de color verde no presenta interferencias (no presenta picos en la región del pico de sulfametoxazol) con el cromatograma de la muestra “Bactrivet” que se encuentra de color azul, los picos no se traslapan, por lo tanto no fue necesario realizar el cálculo de la discrepancia, sin embargo se realiza el cálculo de la Resolución de los picos para verificar que no haya sobreposición. En el cálculo de la Resolución se debe obtener un valor mayor o igual a 1.5 para determinar la separación de los picos.

$$Rs = \frac{(t_R 2 - t_R 1)}{0.5 (W_1 + W_2)}$$

$$Rs = \frac{(3.482 - 0.898)}{0.5 (1.9 + 1.3)} = 1.61$$

Considerando que para que exista una separación total de dos picos adyacentes el valor de la resolución debe ser superior a 1,5 y el valor calculado es 1,61 en consecuencia los dos picos adyacentes están completamente separados y no interferirán en los análisis.

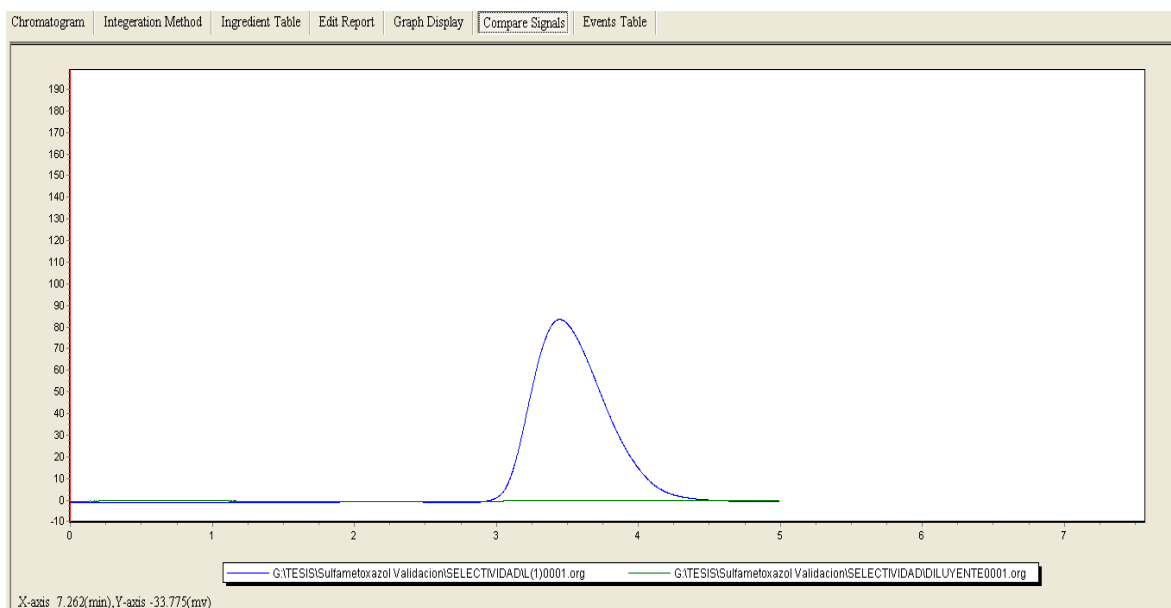


Figura 3-3. Comparación del cromatograma de la muestra y cromatograma del diluyente metanol.

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Figura 3-3 se evidencia que el cromatograma del diluyente (metanol) que se encuentra de color verde no presenta ningún pico cromatográfico que interfiera con la muestra de “Bactrivet” que se encuentra de color azul. Por lo tanto no fue necesario realizar el cálculo de la discrepancia.

3.1.1.2. Linealidad

Para el cálculo de la linealidad se preparan muestras a 5 concentraciones diferentes del estándar sulfametoxazol de pureza de 99.5%, y se inyectó cada muestra durante 5 días. Los resultados de las áreas obtenidas se indican en Tabla 1-3, así mismo los datos obtenidos del cálculo de la Regresión Lineal y del Análisis Simple de Varianza ANOVA se detallan en el Anexo 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1-3. Análisis de Datos de la Linealidad

Días de determinación	Concentración (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²	f(y/x)	PROMEDIO AREAS
Día 1	0	0	0	0	0	0	0
Día 2	0	0	0	0	0	0	
Día 3	0	0	0	0	0	0	
Día 4	0	0	0	0	0	0	
Día 5	0	0	0	0	0	0	
Día 1	0.08	4107254.5	328584.28	0.0064	2.08317E+13	51340681.3	4108139.3
Día 2	0.08	4107303.5	328584.28	0.0064	2.08312E+13	51341293.8	
Día 3	0.08	4098419.5	327873.56	0.0064	2.08323E+13	51230243.8	
Día 4	0.08	4107342.5	328587.4	0.0064	2.08683E+13	51341781.3	
Día 5	0.08	4120376.5	329630.12	0.0064	2.085E+13	51504706.3	
Día 1	0.09	4564178.5	410776.065	0.0081	2.08317E+13	50713094.4	4565380.86
Día 2	0.09	4564118.5	410770.665	0.0081	2.08312E+13	50712427.8	
Día 3	0.09	4564244.5	410782.005	0.0081	2.08323E+13	50713827.8	
Día 4	0.09	4568178.4	411136.056	0.0081	2.08683E+13	50757537.8	
Día 5	0.09	4566184.4	410956.596	0.0081	2.085E+13	50735382.2	
Día 1	0.1	5054328.25	505432.825	0.01	2.55462E+13	50543282.5	5054347.4
Día 2	0.1	5054422.5	505442.25	0.01	2.55472E+13	50544225	
Día 3	0.1	5054545.25	505454.525	0.01	2.55484E+13	50545452.5	
Día 4	0.1	5054187.5	505418.75	0.01	2.55448E+13	50541875	
Día 5	0.1	5054253.5	505425.35	0.01	2.55455E+13	50542535	
Día 1	0.11	5688069.5	625687.645	0.0121	3.23541E+13	51709722.7	5685555.35
Día 2	0.11	5684094	625250.34	0.0121	3.23089E+13	51673581.8	
Día 3	0.11	5683942	625233.62	0.0121	3.23072E+13	51672200	
Día 4	0.11	5683882.25	625227.0475	0.0121	3.23065E+13	51671656.8	
Día 5	0.11	5687789	625656.79	0.0121	3.23509E+13	51707172.7	
Día 1	0.12	6084783.5	730174.02	0.0144	3.70246E+13	50706529.2	6084835.1
Día 2	0.12	6084561.5	730147.38	0.0144	3.70219E+13	50704679.2	
Día 3	0.12	6085395	730247.4	0.0144	3.7032E+13	50711625	
Día 4	0.12	6084782	730173.84	0.0144	3.70246E+13	50706516.7	
Día 5	0.12	6084653.5	730158.42	0.0144	3.7023E+13	50705445.8	
SUMA	2.5	127491290.1	13002811.23	0.255	6.82913E+14	1275077476	
PROMEDIO	0.1	5099651.602	520112.4492	0.0102	2.73165E+13	51003099	

Realizado por: Jacqueline Suárez

Para los datos obtenidos durante los cinco días a las diferentes concentraciones se realizó:

- Curva de Calibración, se especifica en la Figura 4-3
- Ecuación de la recta, que se detalla en la Tabla 2-3
- Test de Cochran, que se detalla en la Tabla 3-3

- Test de Verificación de la Pendiente o Linealidad, que se detalla en la Tabla 4-3
- Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad, que se detalla en la Tabla 6-3

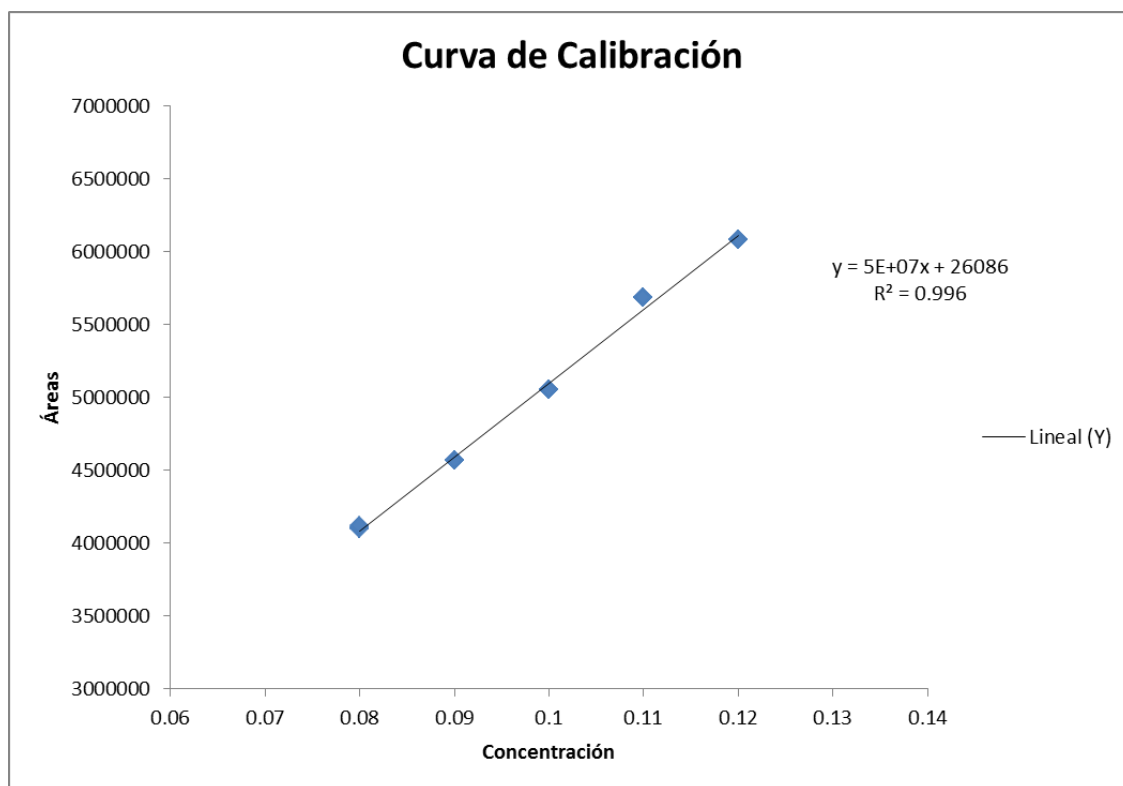


Figura 4-3. Curva de Calibración

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 2-3. Ecuación de la Recta

b	50735660.9
a	26085.512
r	0.997983573
r ²	0.995971213

Realizado por: Jacqueline Suárez

$$y = b \cdot x + a$$

En la Tabla 2-3 se evidencia que el valor calculado del Coeficiente de Correlación (r) es de 0.9979, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación que es de 0.995.

Tabla 3-3. Test de Homogeneidad (Test de Cochran)

Día	% Teórico	Factor respuesta (y/x)	Promedio	Desv. Estándar	Varianza
1	80	51340.68125	51341.25208	0.551182441	0.30380208
2	80	51341.29375			
3	80	51341.78125			
1	90	50713.09444	50713.11667	0.7002645	0.49037037
2	90	50712.42778			
3	90	50713.82778			
1	100	50543.2825	50542.56417	0.704203155	0.49590208
2	100	50541.875			
3	100	50542.535			
1	110	51673.58182	51672.47955	0.992479469	0.9850155
2	110	51672.2			
3	110	51671.65682			
1	120	50706.52917	50706.16389	0.62188576	0.3867419
2	120	50706.51667			
3	120	50705.44583			
		SUMA	204269.4125		
		PROMEDIO	50995.11527		
		G exp	0.37		
		G tab	0.68		

Realizado por: Jacqueline Suárez

$G_{exp} < G_{tablas}$: La varianza de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla 4-3. Test de Verificación de la Pendiente o Linealidad

S^2_b	$4,53^{11}$
$S^2_{y,x}$	2263582719
S_b	672842.138
t EXP	75.40499923
t TABLAS (n-2, α 0,05)	1.7139

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 5-3. Intervalos de Confianza para la Pendiente

Intervalos de Confianza de la Pendiente
$4,53 \times 10^{11} \pm 1153184,14$

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 4-3 se observa que el $t_{exp} > t_{tablas}$; hay correlación lineal entre la concentración del analito y la respuesta del equipo, por lo tanto cumple con el test de t de Student de la Pendiente.

Tabla 6-3. Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad

S^2_a	4617708741
$S^2_{y,x}$	2263582719
s_a	67953.725
t EXP	0.383871701
t TABLAS (n-2, α 0,05)	1.7139

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 7-3. Intervalos de Confianza para la Variable Independiente

Intervalos de Confianza de la Variable Independiente
$4617708741 \pm 116465,889$

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 6-3 se observa que el $t_{exp} < t_{Tablas}$; hay correlación lineal entre la concentración del analito y la respuesta del equipo, por lo tanto, cumple con el test de T de Student de la Variable independiente.

3.1.1.3. Precisión del Sistema

Preparar 4 soluciones del estándar de Sulfametoxazol de pureza de 99.5%, e inyectar 3 repeticiones del estándar por cada día. La determinación se realizará durante 5 días.

Tabla 8-3. Análisis de datos de la Precisión del Sistema

ESTÁNDAR	REPETICIONES	AREAS					MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	CV %	Criterio (CV \leq 2%)
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5				
E 1	R 1	4525175,5	4544287,5	4539584,5	4530458,5	4529842,5	4551783,8	20369,86	0,4475138	Cumple
	R 2	4583946	4558403,5	4587224,5	4551735	4574520,5				
	R 3	4541895	4567328,5	4528636	4547325,25	4566394,5				
E 2	R 1	5232054,5	5328544,5	5298145,5	5348526,5	5242872	5312511,6	47648,851	0,8969176	Cumple
	R 2	5347003	5352452,5	5278528,5	5341886,5	5278431				
	R 3	5370873	5369876,5	5254731,5	5357423	5286325				
E 3	R 1	4773111	4745846,5	4768743,5	4762469,5	4758135,5	4761185,4	12904,458	0,2710346	Cumple
	R 2	4739951,5	4744354,5	4770258	4766543,25	4739643				
	R 3	4776791	4758429	4769784,5	4775291,5	4768428,5				
E 4	R 1	4719632,5	4739442,5	4824296	4765827,5	4795482,5	4776020	43294,679	0,9065012	Cumple
	R 2	4839348,5	4712583,5	4818725,5	4761168	4783595,5				
	R 3	4773144,5	4722039,5	4812433,5	4739836,5	4832743,25				

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la tabla 8-3 se evidencia que el instrumento no presenta variabilidad fuera de los criterios de aceptación, en cada una de los estándares analizados. Se obtuvo para todos los casos un Coeficiente de Variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD) < 2%. Por lo tanto el Sistema es preciso.

3.1.1.4. Precisión del Método

Preparar 1 solución de la muestra Bactrivet de tres lotes distintos. Inyectar 2 repeticiones de cada muestra por día. La determinación se realizará durante 5 días.

Tabla 9-3. Análisis de datos de la Precisión del Método

LOTES (MUESTRAS)	REPETICIONES	AREAS					MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	CV %	Criterio (CV ≤ 2%)
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5				
LOTE 1 (F08725-1)	R 1	4657095,5	4662487,5	4670547,5	4668417	4664752,5	4667858,8	4824,1253	0,1033477	Cumple
	R 2	4672222,5	4671178,5	4669723,5	4671198,5	4665421,5				
LOTE 2 (F08918-1)	R 1	4962914	4975482,5	4969485,5	4970244,5	4976987,5	4973167,2	5900,5465	0,1186477	Cumple
	R 2	4980736,5	4980472,5	4978147,5	4967854,5	4971457,5				
LOTE 3 (F09161-1)	R 1	4921501	4925475,5	4924756,5	4924524	4929784,5	4924677,7	2498,1168	0,0507265	Cumple
	R 2	4927988	4923785,5	4922549,5	4926841,5	4926428,5				

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 4. Cálculo de los Intervalos de Confianza para la Precisión del Método

Intervalos de Confianza de los Resultados Promedios	
LOTE 1	4667858,8 ± 4199,001
LOTE 2	4973167,2 ± 5135,937
LOTE 3	4924677,7 ± 2174,403

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 9-3 se observa el análisis de los datos de cada lote encontrando una variabilidad de áreas obtenidas entre cada lote. Se obtuvo para cada uno de los lotes un Coeficiente de Variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD) < 2%. Por lo tanto el Método es preciso.

3.1.1.5. Repetibilidad

Este ensayo deberá ser realizado por el mismo analista, en el mismo equipo. Preparar 1 muestra de Bactrivet al 100% de tres lotes diferentes. Inyectar 2 repeticiones de cada muestra por día. La determinación se realizará durante 1 día.

Tabla 11-3. Análisis de datos de la Repetibilidad

LOTES (MUESTRAS)	CONCENTRACIÓN	REPETICIONES	AREAS	MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	CV %	Criterio (CV ≤ 2%)
LOTE 1 (F08725-1)	100	R 1	4899943	4886407,75	19141,7341	0,39173428	Cumple
	100	R 2	4872872,5				
LOTE 2 (F08918-1)	100	R 1	4733289	4723854,75	13342,0443	0,28243977	Cumple
	100	R 2	4714420,5				
LOTE 3 (F09161-1)	100	R 1	5089963,5	5091946,5	2804,38549	0,05507492	Cumple
	100	R 2	5093929,5				

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 12-35. Cálculo de los Intervalos de Confianza para la Repetibilidad

Intervalos de Confianza de los Resultados Promedios	
LOTE 1	4886407,75 ± 16664,017
LOTE 2	4723854,75 ± 11615,042
LOTE 3	5091946,5 ± 2441,384

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 11-3 se observa el análisis de los datos de cada lote evidenciándose variabilidad de áreas obtenidas entre cada lote. Se obtuvo para cada uno de los lotes un Coeficiente de Variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD) < 2%. Por lo tanto el Método tiene buena repetibilidad.

3.1.1.6. Precisión Intermedia

Determinar la variabilidad del método sobre muestras preparadas en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes. Preparar 1 solución de Bactrivet a una concentración del 100% de tres lotes distintos. Inyectar 2 repeticiones de cada muestra por día. La determinación se realizará durante 5 días. Con 2 diferentes analistas, cada analista prepara diferentes muestras para su análisis.

Tabla 13-3. Análisis de datos de la Precisión Intermedia

LOTES (MUESTRAS)	ANALISTAS	CONCENTRACIÓN	REPETICIONES	ÁREAS					MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	CV %	Criterio (CV ≤ 2%)
				DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5				
LOTE 1 (F08725-1)	ANALISTA 1	0,1	R 1	5368544,5	5394124,5	5429842,5	5408746,5	5327814,5	5402704	37157,095	0,68775	Cumple
		0,1	R 2	5458516,5	5411984,5	5387896	5399785,5	5439784,5				
	ANALISTA 2	0,1	R 1	5875325,5	5869743,5	5870357	5866759,5	5863687,5	5866300,2	6437,4507	0,109736	Cumple
		0,1	R 2	5855506	5858461,5	5863429,5	5874584,5	5865147,25				
LOTE 2 (F08918-1)	ANALISTA 1	0,1	R 1	4396591,5	4399842,5	4457852,25	4470596,5	4397984,5	4437392,4	38925,836	0,877223	Cumple
		0,1	R 2	4488129,5	4398751,5	4414538,5	4481785,5	4467851,5				
	ANALISTA 2	0,1	R 1	4183805,25	4254434,5	4197856,5	4267431,5	4277149,5	4255923,8	35930,656	0,84425	Cumple
		0,1	R 2	4287388	4274626	4278524,25	4257436,5	4280585,5				
LOTE 3 (F09161-1)	ANALISTA 1	0,1	R 1	4208930,5	4205784,5	4206684,5	4207568,25	4205367,5	4206419,7	1476,2277	0,035095	Cumple
		0,1	R 2	4204345,5	4206874,5	4205548,5	4204948,5	4208145				
	ANALISTA 2	0,1	R 1	4797576	4687244,5	4728426,5	4741668,5	4790548,5	4726991,3	41484,22	0,877603	Cumple
		0,1	R 2	4694185,5	4675153,5	4724683,5	4732867	4697559,5				

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 13-3 se observa que existe variabilidad entre los resultados de cada analista, que se debe a que cada uno prepara diferentes muestras para el análisis, así como variabilidad en los resultados obtenidos para cada lote. La estimación de la precisión intermedia se realizó con el cálculo del coeficiente de variación entre analistas para cada uno de los lotes. Se obtuvo un Coeficiente de Variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD) < 2%. Por lo tanto el método es preciso en estas condiciones.

3.1.1.7. Exactitud

Preparar 3 soluciones de estándar de Sulfametoxazol de pureza de 99.5% a diferentes concentraciones. Inyectar 3 repeticiones de cada solución de estándar por día. La determinación se realizará durante 5 días.

Tabla 14-3. Análisis de datos de la Exactitud

CONCENTRACIÓN mg/ml	CONCENTRACIÓN %	REPETICIONES	ÁREAS					MEDIA	% SULFAMETOXAZOL	% RECUPERACIÓN	Criterio %Recuperación (98 - 102%)
			DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5				
0,09	90	R 1	4853476	4866694,5	4864378,5	4829756,5	488237,5	4562279,7	90,88843007	100,9871445	Cumple
		R 2	4834808,50	4889370,5	4873178	4837287,5	4837644,5				
		R 3	4828486,50	4850275,5	4851171,25	4880184	4849246,5				
0,1	100	R 1	5067186,5	5143384,5	5068745,25	5047823,5	5139842,5	5087778,6	101,357268	101,357268	Cumple
		R 2	5070039,5	5054128,25	5147893,5	5066745,5	5047823,25				
		R 3	5032422,5	5167783	5055296,5	5167821,5	5039743				
0,11	110	R 1	5444069	5566495	5478434,5	5515482,25	5434772,5	5478726,6	109,1456218	99,22329253	Cumple
		R 2	5448738,5	5504294	5448341,5	5428493,5	5414783,25				
		R 3	5445810	5467581,5	5578942	5479872	5524789				

Área muestra 100%	5019648,5
-------------------------	-----------

Realizado por: Jacqueline Suárez

En la Tabla 14-340 se evidencia que el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones, se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecido que fue de 98 – 102%. Por lo tanto el Método es exacto.

3.1.1.8. Límite de Detección (LD)

$$LD_y = Y_B + 3S_B$$

$$Y_B = a = 26085.512$$

$$S_B = S_{y/x} = 47577.1239$$

$$LD_y = 26085.512 + 3 * 47577.1239 = 168816.884$$

$$LD_x = \frac{y - a}{b}$$

$$LD_x = \frac{168816.884 - 26085.512}{50735660.9} = 0.00281$$

La concentración mínima detectable es 0.00281 mg/mL

3.1.1.9. Límite de Cuantificación (LC)

$$LC_y = Y_B + 10S_B$$

$$Y_B = a = 26085.512$$

$$S_B = S_{y/x} = 47577.1239$$

$$LD_y = 26085.512 + 10 * 47577.1239 = 501856.751$$

$$LD_x = \frac{y - a}{b}$$

$$LD_x = \frac{501856.751 - 26085.512}{50735660.9} = 0.00938$$

La concentración mínima cuantificable es 0.00938 mg/mL

3.1.1.10. Robustez

Tabla 6. Esquema de los Factores de variación

Factores de Variación		Condiciones	-	+
(A)	Temperatura de la columna	25°C ± 8 °C	17°C	33°C
(B)	Volumen de Inyección	20ul ± 5 ul	15 ul	25 ul
(C)	Flujo	1 ml / min +0.1	0,9 ml/min	1,1 ml/min

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 16-3. Matriz Factorial para el Análisis de la Robustez

		FACTORES			INTERACCIONES			
		Temperatura de la columna (A)	Volumen de Inyección (B)	Flujo (C)	AB	AC	BC	ABC
M1	1	-	-	-	+	+	+	-
	2	+	-	-	-	-	+	+
M2	3	-	+	-	-	+	-	+
	4	+	+	-	+	-	-	-
M3	5	-	-	+	+	-	-	+
	6	+	-	+	-	+	-	-
M4	7	-	+	+	-	-	+	-
	8	+	+	+	+	+	+	+

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 7. Determinación de las áreas obtenidas en los diferentes análisis de las Muestras

		ÁREAS		
		Temperatura de la columna (A)	Volumen de Inyección (B)	Flujo (C)
M1	1	5070418.5	4795893.5	5069745.5
	2	5062687.5	4701147.25	5068987.25
M2	3	5071128.25	5466874.4	5070974.5
	4	5062791.5	5478942.5	5071974.5
M3	5	5071205.5	4702789	5072478.25
	6	5061874.25	4703987.25	5068511.5
M4	7	5072398.5	5337921.4	5071298.25
	8	5059974.25	5329143.5	5069479.5

Realizado por: Jacqueline Suárez

Tabla 18-3. Determinación de la Concentración (%) de Sulfametoxazol obtenidas

		CONCENTRACIÓN DE SULFAMETOXAZOL		
		Temperatura de la columna (A)	Volumen de Inyección (B)	Flujo (C)
M1	1	100.06	94.65	100.05
	2	99.91	92.78	100.04
M2	3	100.08	107.89	100.07
	4	99.91	108.13	100.09
M3	5	100.08	92.81	100.10
	6	99.90	92.83	100.03
M4	7	100.10	105.34	100.08
	8	99.86	105.17	100.05
MEDIA		99.99	99.95	100.06
DESV. ESTANDAR		0.101714855	7.245055468	0.028661913
CV%		0.101727437	7.248773636	0.028643572
		ESTÁNDAR 100%		
		5067186.5		

Realizado por: Jacqueline Suárez

*Intervalos de Confianza para cada uno de los Factores***Tabla 19-3.** Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor A

S exp	0,101714855
t (n-2; α 0,05)	1,943
n	8
A \pm	0,08069905

Realizado por: Jacqueline Suárez

El factor de la Temperatura de la columna no presenta, mayor variación en la Valoración de Sulfametoxazol.

Tabla 20-3. Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor B

Sexp	7,245055468
t (n-2; α 0,05)	1,943
n	8
A \pm	5,748118732

Realizado por: Jacqueline Suárez

El factor B, volumen de inyección influye notablemente en la valoración de Sulfametoxazol, existe variación en las áreas.

Tabla 21-3. Determinación del Intervalo de Confianza para el Factor C

S exp	0,028661913
t (n-2; α 0,05)	1,943
n	8
A ±	0,022739933

Realizado por: Jacqueline Suárez

El factor C, flujo no interfiere directamente en la valoración de Sulfametoxazol, pero influye directamente en el tiempo de retención de los picos.

3.1.1.11. Incertidumbre

Se determina las fuentes de Incertidumbre mediante un diagrama de espina de pescado que se detalla en el Anexo 3

Cálculo de la incertidumbre tipo A

Tabla 22-3. Cálculo de incertidumbre tipo A

ANALISTAS	REPETICIONES	AREAS					MEDIA	DESV. ESTÁNDAR	CV % / RSD	PROMEDIO RSD
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5				
ANALISTA 1	R 1	5368544,5	5394124,5	5429842,5	5408746,5	5327814,5	5402703,95	37157,09485	0,687749971	0,39874305
	R 2	5458516,5	5411984,5	5387896	5399785,5	5439784,5				
ANALISTA 2	R 1	5875325,5	5869743,5	5870357	5866759,5	5863687,5	5866300,175	6437,450746	0,109736129	
	R 2	5855506	5858461,5	5863429,5	5874584,5	5865147,25				

Realizado por: Jacqueline Suárez

$$u = \frac{RSD \text{ promedio}}{\sqrt{n}} = \frac{0.39874305}{\sqrt{20}} = 0.08916$$

Cálculo de la incertidumbre tipo B

Cálculo de incertidumbre pesada

Calibración de la balanza u_{bal}

Según la información proporcionada por el certificado de calibración Número 0415-16-14 del 20 de Marzo del 2014 del Laboratorio de Calibración ELICROM la incertidumbre de la masa patrón de 1000 mg es 0.00058 mg (k=2)

$$u_{bal} = \frac{I_{cal}}{K} = \frac{0.00058 \text{ mg}}{2} = 0.00029 \text{ mg}$$

Tabla 23-3. Repetibilidad de la pesada para el cálculo de la Incertidumbre (u_{Rep})

Nº lectura	Lecturas de la pesa (g)
1	1.00174
2	1.00176
3	1.00173
4	1.00176
5	1.00176
6	1.00173
7	1.00176
8	1.00176
9	1.00176
10	1.00174
PROM.	1.00175
DESV. EST.	1.33333×10^{-5}

Realizado por: Jacqueline Suárez

$$u_{Rep} = \frac{Desv.Est}{\sqrt{n}} = \frac{1.333 \times 10^{-5} g}{\sqrt{10}} = 4.215 \times 10^{-6} g = 4.215 \times 10^{-3} mg$$

Especificación de las masas u_{masas}

Según la información proporcionada por el certificado de calibración Número LNM-M-2014-229 del 05 de Agosto del 2014 del Laboratorio Nacional de Metrología del Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) la incertidumbre de la masa patrón de 1000 mg es 0.030 mg ($k=2$)

$$u_{masas} = \frac{I_{cal}}{K} = \frac{0,03mg}{2} = 0.015mg$$

Entonces:

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{masas})^2 + (u_{rep})^2}$$

$$u_{mstd} = \sqrt{(0.00029 mg)^2 + (4.215 \times 10^{-3} mg)^2 + (0.015 mg)^2}$$

$$u_{mstd} = 0.0155 mg$$

$$\text{Desarrollando: } \left(\frac{u(mstd)}{Mstd} \right)^2$$

$$\left(\frac{0.0155mg}{1000mg}\right)^2 = 2.402 \times 10^{-10}$$

Cálculo de incertidumbre por dilución

Pureza Material de referencia (99.5 ± 0.5) mg, en base al certificado otorgado por el laboratorio fabricante del patrón de referencia Sigma Aldrich.

Balón de (10 ± 0.025) mL, en base al certificado otorgado por el laboratorio Glassco, número 130.202.02, del 28 de junio del 2014.

Pipeta automática (1 ± 0.008) mL, en base al certificado otorgado por el laboratorio Laboratorio de Calibración ELICROM, número 1833-13-14, del 05 de noviembre del 2014.

Expresión del cálculo de incertidumbre asociado al proceso de dilución

$$C_{std} = \frac{P_{std}}{V_{inicial}} = \frac{25mg}{25 mL} = 1mg/mL$$

Incertidumbre de C (std)

$$C_{std} \pm \sqrt{\left(\frac{I_{MR}}{P_{std}}\right)^2 + \left(\frac{I_{std} b_i}{P_{std}}\right)^2}$$

$$C_{std} = 1mg/ml \pm \sqrt{\left(\frac{0.5}{25}\right)^2 + \left(\frac{0.04}{25}\right)^2}$$

$$C_{std} = 1mg/ml \pm 0.020$$

$$C_{dil} = \frac{C_{std} \times V_{std}}{V_{final}} = \frac{1mg/mL \times 1mL}{10mL} = 0.1mg/mL$$

Incertidumbre del Estándar

$$\left(\frac{u(C_{std})}{C_{std}}\right)^2 = \left(\frac{0.020}{1mg/mL}\right)^2 = 4 \times 10^{-4}$$

Incertidumbre de la Alícuota

$$\left(\frac{u(Vstd)}{Vstd}\right)^2 = \left(\frac{0.008}{1mL}\right)^2 = 6.4 \times 10^{-5}$$

Incertidumbre del Balón

$$\left(\frac{u(Vfinal)}{Vfinal}\right)^2 = \left(\frac{0.025}{10mL}\right)^2 = 6.25 \times 10^{-6}$$

Sustituyendo las Incertidumbres parciales en la ecuación general de la Incertidumbre por dilución tenemos:

$$u(c) = C(dil) \times \sqrt{\left(\frac{u(Cstd)}{Cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(Vstd)}{Vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(Vfin)}{Vfin}\right)^2}$$

$$u(c) = 0.1mg/mL \times \sqrt{(4 \times 10^{-4})^2 + (6.4 \times 10^{-5})^2 + (6.25 \times 10^{-6})^2}$$

$$u(c) = 4.05 \times 10^{-5} mg/mL$$

Tabla 24-3. Cuadro resumen de los tipos de Incertidumbre

Incertidumbre tipo B	
U peso	2.402x10 ⁻¹⁰
U diluciones	4.05x10 ⁻⁵
Incertidumbre tipo A	
U reproducibilidad	0.08916

Realizado por: Jacqueline Suárez

La incertidumbre tipo B en el presente trabajo se divide en la incertidumbre de dilución y pesada, en este caso la incertidumbre de la pesada es menor con respecto a la incertidumbre de la dilución. De igual forma la incertidumbre tipo A por ser 3 magnitudes mayores que la incertidumbre tipo B que es la representación final de la incertidumbre combinada para esta metodología analítica por HPLC.

Cálculo de la Incertidumbre Combinada

Ahora la incertidumbre combinada final es la siguiente:

$$u_c = \sqrt{(u_{tipo A})^2 + (u_{tipo B})^2}$$

$$u_c = \sqrt{(0.08916)^2 + (4.05 \times 10^{-5})^2}$$

$$u_c = 0.089$$

Cálculo de la Incertidumbre expandida

Teniendo el resultado de la incertidumbre combinada estándar podemos calcular la incertidumbre expandida (U). Del método analítico antes validado.

$$U = K * u_c$$

$$U = 2 * 0.089$$

$$U = 0.18\%$$

3.2. Pruebas de hipótesis

Generar resultados confiables a partir del cumplimiento de los criterios establecidos para cada uno de los parámetros de validación mencionados en el Plan Maestro de Validaciones de la empresa FARBIOVET S.A.

3.3. Presentación de resultados

Tabla 25-3. Presentación de Resultados

ENSAYOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS	CRITERIO
Selectividad	% de Discrepancia, en caso de existir interferencias < 3%	No se presentan interferencias.	CUMPLE
Linealidad	$r \geq 0.995$	$r = 0.9979$	CUMPLE
Precisión del Sistema	$RSD \text{ ó } CV \leq 2 \%$	$RSD \text{ ó } CV = < 2 \%$	CUMPLE
Precisión del Método	$RSD \text{ ó } CV \leq 2\%$; $CV \leq 2\%$	$RSD \text{ ó } CV = < 2 \%$	CUMPLE
• Repetibilidad	$RSD \leq 2\%$; $CV \leq 2\%$	$RSD \text{ ó } CV = < 2 \%$	CUMPLE
• Precisión Intermedia	$RSD \leq 2\%$; $CV \leq 2\%$	$RSD \text{ ó } CV = < 2 \%$	CUMPLE
Exactitud	% de Recuperación 98% - 102%	99 % - 101 %	CUMPLE
Límite de detección	Determinación de la mínima concentración detectable.	$LD = 0.00281 \text{ mg/mL}$	----
Límite de Cuantificación	Determinación de la mínima concentración cuantificable.	$LC = 0.00938 \text{ mg/mL}$	----
Robustez	Método óptimo, interacción de mayor influencia.	Mayor fuente de variabilidad por el volumen de inyección.	----
Incertidumbre	< 40%	0.18%	CUMPLE

Realizado por: Jacqueline Suárez

CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico para valorar Sulfametoxazol en el producto veterinario Bactrivet presentación comercial (suspensión oral 60 mL) mediante HPLC, producido por la empresa FARBIOVET S.A.
- Los parámetros analíticos establecidos en la validación del método para valorar sulfametoxazol fueron Selectividad, Linealidad, Precisión del Sistema, Precisión del Método, Repetibilidad, Precisión Intermedia, Exactitud, Límites de Detección, Límites de Cuantificación, Robustez e Incertidumbre, los mismos que están dentro del intervalo de límites establecidos por la empresa, dentro del Plan Anual de Validaciones
- En base al análisis estadístico de los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros realizados se determinó en la selectividad que no se evidencian picos cromatográficos que se traslapen con el pico de sulfametoxazol, por lo tanto no se presentan interferencias; en el análisis de Linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0.9979 que se encuentra dentro de los parámetros establecidos ≥ 0.995 ; para las Precisiones de: Sistema, Método, Repetibilidad e Intermedia se obtuvo en todos los casos un coeficiente de variación o Desviación estándar Relativa menor a 2 %, por lo que se determina que cumplen con los criterios establecidos que para todos los casos es $\leq 2\%$; para la Exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación de entre 99% a 101% que se encuentran dentro de los límites establecidos que son de 98% – 102%; para el Límite de detección el valor de la concentración encontrada fue 0.00281 mg/mL y para el Límite de Cuantificación la concentración fue de 0.00938 mg/mL; en la Robustez se determinó que existe mayor fuente de variabilidad en las lecturas obtenidas cuando se modifica el volumen de inyección, por lo tanto es necesario inyectar la misma cantidad de volumen y el método posee una Incertidumbre de 0.18 % que cumple con el criterio establecido que es $< 40\%$.
- Se estableció un Protocolo de Validación en el cual se documenta todos los procedimientos para la validar el método de valoración de sulfametoxazol, de una manera clara que identifica cada uno de los procesos a seguir.

RECOMENDACIONES

Es importante una adecuada agitación de la suspensión oral de Bactrivet, para homogenizar el producto antes de la preparación de las muestras.

Controlar la temperatura en el baño del sonicador, no debe ser alta debido a que se puede evaporar con facilidad el metanol, provocando que la muestra se concentre.

Es importante degasificar la fase móvil después de filtrarla y no conservar la misma fase móvil por más de 48 horas, y de igual manera no conservar las muestras, en el caso de que sea necesario se almacena en refrigeración.

No variar el volumen de inyección en ninguno de los análisis, se produce variabilidad en las áreas obtenidas de las muestras.

Al terminar las inyecciones en el equipo HPLC o al final del día es adecuado el correcto lavado de la columna, que se realiza durante dos horas con agua grado HPLC a un flujo de 1 mL/min, y posterior se lava durante 30 minutos con Acetonitrilo grado HPLC a un flujo de 1 mL/min.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ARRIOLA, L.** *Validación de Métodos Analíticos, Fisicoquímicos y Microbiológicos.* Guatemala-Guatemala. 2012, pp. 8-15.
Disponible en:
http://www.medicamentos.com.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validaci%C3%B3n_de_M%C3%A9todos_Anal%C3%ADticos_con_formulas.pdf
2015/02/09
2. **BARAHONA, G.** *Cuaderno de Prácticas de Farmacología, Farmacia y Terapéutica.* Departamento de Toxicología y Farmacología Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid. Curso Académico. Madrid-España. 2011-2012. pp.2-12
3. **BOTANA, L.** *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* Madrid-España: McGraw-Hill Interamericana. 2002. p. 452.
4. **CHILE, INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA CHILE.** *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”.* Guía Técnica N°1. Santiago- Chile. 2010. pp. 21-52.
5. **CHROMACADEMY.** *E-learning for the analytical chemistry community.* The Theory of HPLC.[on line] Crawford Scientific. USA. pp. 3-12.
Disponible en: www.chromacademy.com
2015/02/09
6. **COSTA RICA, REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO. RTCA 11.03.39: 06.** *Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.* Anexo de la Resolución No. 188-2006 (COMIECO-XL). San José-Costa Rica. 2010. pp. 5-6
Disponible en:
<http://www.cssp.gob.sv/phocadownload/Reglamento%20Tecnico%20Centroamericano%20RTCA%2011.03.39%2006.pdf>
2015/02/12
7. **ESPAÑA, ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA.** *Validación de Métodos Analíticos.* Gerona-España: Gispert S.A. 2001. pp. 45-105

8. **FARBIOVET S.A.** *Política de Calidad.*

Disponible en: <http://www.farbiovet.com/index.php/inicio>

2015/03/02

Dosis Producto Bctrivet.

Disponible en: <http://www.farbiovet.com/index.php/veterinario/>

2015/03/02

9. **GENÉRICOS VETERINARIOS.** *Sulfametoxazol GV.*

Disponible en: <http://www.genericosveterinarios.com.mx/p107.html>

2015/03/18

10. **GONZÁLEZ, C.** *Aplicación del Cálculo de Incertidumbre Combinada a la Validación de una Metodología Analítica por HPLC, en un producto que contiene Citalopram Bromhidrato.* (Tesis) (Quím. Farmacéutico). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Química y Farmacia. Valdivia-Chile. 2006. pp.20-51

Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcg643a/doc/fcg643a.pdf>

2015/04/10

11. **GUÍA EURACHEM.** *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos relacionados.* México DF-México: CENAM. 1998. pp. 17-30

12. **GUZMÁN, F.** *Estudio analítico de Sulfamidas, productos asociados y productos de Degradación mediante nuevos métodos de separación.* Cuenca-Ecuador: UCLM. 2005. pp. 5-14

13. **HERNÁNDEZ, JM.** *SEQC. Educación continuada en el Laboratorio. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.* Badalona-España: Cont Lab. 2005. p. 53.

14. **MEDINA, J.& BERROCAL, J.** *Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg. tableta por cromatografía líquida de alta performance.* Lima-Perú. 2008. p. 18

15. **MÉXICO, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.** *Técnicas Cromatográficas* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Química Analítica Instrumental II. México DF-México. 2007. pp. 1-48.

16. **MILLER, J.N. & MILLER, J.C.** *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4. ed. Madrid-España. *Prentice Hall*. 2002. pp. 125 – 217.
17. **PAREDES, V.** *Farmacología Veterinaria II*. Universidad Nacional Agraria. Dirección de Investigación Extensión y Posgrado. Managua – Nicaragua: Editronic.. 2010. pp. 9-18.
Disponible en: <http://cenida.una.edu.ni/Textos/nl70p227fa.pdf>
2015/03/17
18. **SCHMID, W. & LAZOS, R.** *Guía para estimar la Incertidumbre de la Medición*. CENAM. Centro Nacional de Metrología. México DF-México. 2000. p. 20
19. **SUMANO, H. & OCAMPO, L.** *Farmacología Veterinaria*. 3. ed. México DF-México: McGraw-Hill Interamericana. 1997. pp. 128-162.
20. **UNIPHARM.** *Información Farmacológica Sulfametoxazol*.
Disponible en:
http://www.grupounipharm.com/sites/default/files/category_pictures/Farmacolog%C3%ADa%20aunisolprimpolvo%20oral.pdf
2015/03/12

ANEXOS

Anexo A. Regresión Lineal

Resumen						
<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coeficiente de correlación múltiple	0,997983573					
Coeficiente de determinación R ²	0,995971213					
Coeficiente de correlación r	0,997983573					
R ² ajustado	0,995796048					
Error típico	47577,12387					
Observaciones	25					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	1,28705E+13	1,28705E+13	5685,9139	4,7497E-29	
Residuos	23	52062402460	2263582716			
Total	24	1,29226E+13				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	26085,512	67953,72499	0,383871701	0,70459934	-114487,478	166658,502
Variable X 1	50735660,9	672842,1383	75,40499919	4,7497E-29	49343780,9	52127540,9

Análisis de los residuales				
		\hat{Y}	$(Y_i - \hat{Y})$	$(Y_i - \hat{Y})^2$
<i>Observación</i>		<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	
1		4084938,384	22316,116	498009033,3
2		4084938,384	22365,116	500198413,7
3		4084938,384	13481,116	181740488,6
4		4084938,384	22404,116	501944413,7
5		4084938,384	35438,116	1255860066
6		4592294,993	-28116,493	790537178,6
7		4592294,993	-28176,493	793914757,8
8		4592294,993	-28050,493	786830157,5
9		4592294,993	-24116,593	581610057,9
10		4592294,993	-26110,593	681763066,8
11		5099651,602	-45323,352	2054206237
12		5099651,602	-45229,102	2045671668
13		5099651,602	-45106,352	2034582991
14		5099651,602	-45464,102	2066984571
15		5099651,602	-45398,102	2060987665
16		5607008,211	81061,289	6570932574
17		5607008,211	77085,789	5942218866
18		5607008,211	76933,789	5918807890
19		5607008,211	76874,039	5909617872
20		5607008,211	80780,789	6525535871
21		6114364,82	-29581,32	875054492,9
22		6114364,82	-29803,32	888237883
23		6114364,82	-28969,82	839250470,8
24		6114364,82	-29582,82	875143239,2
25		6114364,82	-29711,32	882762536,1
			S_y/x	47577,12387

Anexo B. Análisis Simple de Varianza ANOVA

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	25	2,5	0,1	0,00020833		
Columna 2	25	127491290,1	5099651,602	5,3844E+11		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3,25081E+14	1	3,25081E+14	1207,48678	1,11039E-35	4,042652129
Dentro de los grupos	1,29226E+13	48	2,69221E+11			
Total	3,38003E+14	49				

Anexo C. Fuentes de Incertidumbre

